

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Patrícia Francisco de Oliveira

**OBTENÇÃO EM MEIO SUPERCRÍTICO E FRACIONAMENTO
DO EXTRATO DE *Lippia dulcis* Trev.**

Florianópolis

2010

Patrícia Francisco de Oliveira

**OBTENÇÃO EM MEIO SUPERCRÍTICO E FRACIONAMENTO
DO EXTRATO DE *Lippia dulcis* Trev.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Co-Orientador no exterior: Danielle Barth, PhD.

Florianópolis

2010

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos e o meu reconhecimento a todos aqueles que acompanharam, incentivaram e participaram dessa conquista. Em especial, agradeço:

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), onde foi realizada grande parte dos experimentos desse trabalho.

À CAPES pela oportunidade concedida de realizar parte das atividades no exterior, por meio do programa PDEE.

Ao LRGP (*Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés*) pela acolhida e disposição de sua infraestrutura e equipe para me auxiliar nas atividades.

Aos Professores Ariovaldo Bolzan e Ricardo Machado, orientador e co-orientador desse trabalho, pelo apoio e valiosas contribuições ao desenvolvimento da tese.

À Professora Danielle Barth pelo auxílio e contribuição na ocasião do estágio na França.

À EPAGRI-Itajaí/SC pelo fornecimento das mudas de *Lippia dulcis* Trev., que originou esse trabalho.

Ao colega do LCP Rafael Dias pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Ao apoio técnico recebido na instituição francesa por Hélène Poirot, Steve Pontvianne, Hervé Simonaire, Philippe Arnoux, Anthony Dufour e Professor Jacques Bodiguel.

Aos meus fiéis amigos pela compreensão, paciência e infinita amizade. Vocês sabem o quanto foram importantes nessa caminhada!

E, por último, porém o agradecimento mais importante, à minha família, especialmente aos meus pais, por sempre acreditarem na minha capacidade e nunca me deixarem desanimar. Pelo amor incondicional e certeza dessa vitória!

Nenhuma conquista vale a pena ser saboreada se não pudermos compartilhá-la! Obrigada!

*"Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe e
vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a
quem se atreve..."*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Lippia dulcis Trev. é uma planta de sabor e aroma intensamente adocicados, originária da América tropical. Os compostos presentes nessa planta foram previamente identificados e isolados. Os sesquiterpenos (+)-hernandulcin, responsável pelo sabor doce conferido à planta, e o seu isômero, (-)-*epi*-hernandulcin, foram definidos na literatura científica como constituintes majoritários do extrato. Alguns métodos são tradicionais na obtenção de extratos naturais, como a hidrodestilação e a utilização de solventes orgânicos. Embora a hidrodestilação seja o método definido pela Farmacopéia Brasileira para a extração de óleos essenciais, a alta temperatura do processo pode levar à degradação de compostos termolábeis. Já a utilização de solventes orgânicos tem como inconveniente a necessidade de uma etapa posterior ao processo para a purificação do produto. Nesse contexto, a extração com dióxido de carbono supercrítico oferece vantagens pela temperatura branda de operação e ausência de contaminantes. Na presente tese foram definidos os parâmetros de extração de *Lippia dulcis* Trev. em meio supercrítico, conduzidos em uma unidade piloto de escala laboratorial. Ainda, por meio de técnicas cromatográficas os extratos obtidos foram caracterizados, de modo a identificar e quantificar a substância responsável pelo sabor doce da matriz vegetal, hernandulcin. Os extratos obtidos em meio supercrítico foram comparados em composição aos óleos essenciais resultantes do processo de hidrodestilação. Posteriormente, foi aplicada uma metodologia para o fracionamento do extrato, visando obter uma fração com maior concentração de hernandulcin. Os resultados permitem concluir que o rendimento mássico da extração supercrítica é superior àquele obtido com hidrodestilação. Foi possível identificar a substância edulcorante nos extratos obtidos, bem como outros compostos presentes no óleo e extratos de *Lippia dulcis*. Os percentuais de hernandulcin nos extratos foram de 19,215% (área relativa) e, em média, 40,1% à 42,5% m/m, para a extração em meio supercrítico realizada com a matriz colhida no inverno e verão, respectivamente. Com a metodologia de fracionamento utilizada foi possível separar hernandulcin dos demais compostos presentes no extrato.

ABSTRACT

Lippia dulcis Trev. is an intensely sweet herb originary from tropical America. The constituents present in this plant were previously identified and isolated. The sesquiterpenes (+)-hernandulcin, the sweet principle of this plant, and its isomer, (-)-*epi*-hernandulcin, were defined in the scientific literature as the major compounds. There are some traditional methods which are applied for obtaining natural extracts, such as hydrodistillation and by the use of organic solvents. Although hydrodistillation is commonly applied for the extraction of essential oil, according to the Brazilian Pharmacopoeia, the high temperature needed for this technique may cause thermolabile compounds to degrade. By the use of organic solvents to obtain the extract, there is the inconvenience of having a post processing step in order to purify it. In this context, supercritical fluid extraction has the advantages of operating at mild temperatures and in the absence of contaminants. In the present work the process parameters for the extraction of *Lippia dulcis* Trev. using supercritical CO₂ were defined, conducted in a laboratory scale pilot unit. Also, by using chromatographic techniques extracts were characterized in order to identify and quantify the substance responsible for the sweet taste of the vegetable matrix, hernandulcin. The extracts obtained by supercritical CO₂ were compared in composition to the essential oils derived from hydrodistillation. Subsequently, a separation method was applied to obtain a fraction with higher concentration of hernandulcin. The results indicate that the mass yield of supercritical extraction is superior to that obtained by hydrodistillation. It was possible to identify the sweet compound in the extracts, as well as other compounds present in the essential oil and in the extracts of *Lippia dulcis*. The percentages of hernandulcin in the extracts were 19,215% (relative area) and, 40.1% to 42.5% m/m, average, for the supercritical fluid extraction performed with the plant harvested in winter and summer, respectively. With the methodology used to fractionate the extract it was possible to separate hernandulcin from the other substances in the extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	35
Figura 3.2: Estruturas moleculares de hernandulcin e seu isômero, <i>epi</i> -hernandulcin.....	36
Figura 3.3: Precursores de hernandulcin e, também, seus produtos de degradação: a) 3-metil-2-ciclohexenona; b) 6-metil-5-hepten-2-ona.	37
Figura 3.4: Aparelho para arraste de vapor de água.....	40
Figura 3.5: Aparelho tipo <i>Clevenger</i>	40
Figura 3.6: Diagrama de fases do dióxido de carbono, indicando o ponto crítico. Fonte: Sanders, 1993.....	42
Figura 4.1: Unidade piloto de extração em meio supercrítico.	52
Figura 4.2: Variação da massa específica do CO ₂ com a pressão (ANGUS <i>et al.</i> , 1976).	53
Figura 4.3: Variação da massa específica do CO ₂ com a temperatura (ANGUS <i>et al.</i> , 1976).	54
Figura 4.4: Esquema da unidade piloto de fracionamento dos extratos. Adaptado de Chouchi, 1995.	55
Figura 4.5: Esquema e foto da coluna cromatográfica utilizada para o fracionamento do produto da síntese.	59
Figura 4.6: Exemplo da disposição das frações nas placas de CCD, onde "R" corresponde ao meio reacional, "1...n" as frações coletadas, h_1 = altura da área de medida da placa, h_2 =altura da retenção do composto. Sendo $R_f=h_2/h_1$	59
Figura 5.1: Distribuição de tamanho das partículas de <i>Lippia dulcis</i>	69
Figura 5.2: Placas de CCD correspondentes à primeira e à segunda parte do fracionamento.....	72
Figura 5.3: Espectro de RMN H ⁺ da fração de (±)-hernandulcin.	74
Figura 5.4: Espectro RMN-H ⁺ da fração contendo hernandulcin e um produto de reação secundário.	75

Figura 5.5: Cromatograma de hernandulcin sintetizado obtido por LCMS.	76
Figura 5.6: Espectro de massas de acetofenona.	77
Figura 5.7: Espectro de massas de hernandulcin.	77
Figura 5.8: Curva de extração de <i>Lippia dulcis</i> em meio supercrítico, correspondendo ao período de inverno.	80
Figura 5.9: Curva de extração de <i>Lippia dulcis</i> em meio supercrítico, correspondendo ao período de verão.	81
Figura 5.10: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 1 (hidrodestilação/inverno).	83
Figura 5.11: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 2 (ESC 100bar/35°C – inverno).	83
Figura 5.12: Espectro de massa do pico correspondente a hernandulcin obtido na análise de CG/MS (Metodologia 1).	84
Figura 5.13: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 3 (hidrodestilação/verão).	85
Figura 5.14: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 4 (ESC 120bar/35°C – verão).	86
Figura 5.15: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 5 (ESC 140bar/40°C – verão).	86
Figura 5.16: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 6 (ESC 120bar/35°C – verão).	87
Figura 5.17: Cromatograma do composto hernandulcin derivatizado com TMS.	90
Figura 5.18: Espectro de massas do derivado de hernandulcin com TMS e a estrutura da molécula resultante.	91
Figura 5.19: Comparação entre os cromatogramas do extrato de <i>L. dulcis</i> e do composto hernandulcin puro.	92
Figura 5.20: Comparação espectros de hernandulcin e seu isômero. Amostra do extrato e do composto sintetizado.	93
Figura 5.21: Análise dos extratos de <i>Lippia dulcis</i> por CLAE (254nm).	95

Figura 5.22: Cromatograma CLAE da amostra do Extrato A (Repetição 1) a 254nm.....	96
Figura 5.23: Cromatograma CLAE da amostra do Extrato B (Repetição 1) a 254nm.....	96
Figura 5.24: Resultados de cromatografia a gás (CG/MS) das frações obtidas no processo de adsorção e dessorção com CO ₂ supercrítico (Experimento 2).	99
Figura 5.25: Cromatogramas CLAE (254nm) das amostras do Experimento 2 (extrato original, leite).	102
Figura 5.26: Cromatogramas CLAE (254nm) das amostras do Experimento 2 (separador 1, separador 2).....	103
Figura 5.27: Cromatogramas CLAE à 254nm (1-Extrato, escala analítica; 2-Processo semi-preparativo;.....	105
Figura 5.28: Cromatograma CLAE à 254nm (3-Fração hernandulcin, escala analítica).	106
Figura A.1: Curva de calibração de hernandulcin (205nm).	119
Figura A.2: Curva de calibração de hernandulcin (254nm).	120
Figura A.3: Cromatograma CLAE 205nm para C ₀ = 0,00 mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	121
Figura A.4: Cromatograma CLAE 254nm para C ₀ = 0,00 mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	121
Figura A.5: Cromatograma CLAE 205nm para 1) C ₁ = 5,80x10 ⁻⁵ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	122
Figura A.6: Cromatograma CLAE 254nm para 1) C ₁ = 5,80x10 ⁻⁵ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	122
Figura A.7: Cromatograma CLAE 205nm para 2) C ₂ = 8,70x10 ⁻⁵ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	123
Figura A.8: Cromatograma CLAE 254nm para 2) C ₂ = 8,70x10 ⁻⁵ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	123
Figura A.9: Cromatograma CLAE 205nm para 3) C ₃ = 1,16x10 ⁻⁴ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	124
Figura A.10: Cromatograma CLAE 254nm para 3) C ₃ = 1,16x10 ⁻⁴ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN}	124

Figura A.11: Cromatograma CLAE 205nm para 4) $C_4 = 1,45 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	125
Figura A.12: Cromatograma CLAE 254nm para 4) $C_4 = 1,45 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	125
Figura A.13: Cromatograma CLAE 205nm para 5) $C_5 = 1,74 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	126
Figura A.14: Cromatograma CLAE 254nm para 5) $C_5 = 1,74 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	126
Figura A.15: Cromatograma CLAE 205nm para 6) $C_6 = 2,03 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	127
Figura A.16: Cromatograma CLAE 254nm para 6) $C_6 = 2,03 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	127
Figura A.17: Cromatograma CLAE 205nm para 7) $C_7 = 2,32 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	128
Figura A.18: Cromatograma CLAE 254nm para 7) $C_7 = 2,32 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	128
Figura A.19: Cromatograma CLAE 205nm para 8) $C_8 = 2,61 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	129
Figura A.20: Cromatograma CLAE 254nm para 8) $C_8 = 2,61 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	129
Figura A.21: Cromatograma CLAE 205nm para 9) $C_9 = 2,90 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	130
Figura A.22: Cromatograma CLAE 254nm para 9) $C_9 = 2,90 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	130
Figura A.23: Cromatograma CLAE 205nm para 10) $C_{10} = 4,06 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	131
Figura A.24: Cromatograma CLAE 254nm para 10) $C_{10} = 4,06 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	131
Figura A.25: Cromatograma CLAE 205nm para 11) $C_{11} = 5,80 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	132
Figura A.26: Cromatograma CLAE 254nm para 11) $C_{11} = 5,80 \times 10^{-4}$ mg _{hernandulcin} /μL _{ACN} ·	132

Figura B.27: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de limoneno.	133
Figura B.28: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de cariofileno.	134
Figura B.29: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de α -bisabolol.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características dos compostos hernandulcin e seu isômero, (-)- <i>epi</i> -hernandulcin	37
Tabela 4.1: Identificação dos lotes de <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	47
Tabela 4.2: Série de peneiras utilizada nos experimentos.	50
Tabela 4.3: Condições experimentais utilizadas para hidrodestilação.	51
Tabela 4.4: Condições experimentais utilizadas na extração em meio supercrítico.	53
Tabela 4.5: Parâmetros experimentais de fracionamento.	56
Tabela 4.6: Identificação das amostras analisadas por cromatografia a gás (CG/FID e CG/MS).	62
Tabela 4.7: Parâmetros analíticos para CG-FID e CG-MS.	63
Tabela 5.1: Características do leite de sólidos.	68
Tabela 5.2: Identificação por CCD dos compostos obtidos na síntese e no extrato de <i>L.dulcis</i>	70
Tabela 5.3: Frações obtidas na cromatografia em coluna.	71
Tabela 5.4: Ensaios de hidrodestilação de <i>Lippia dulcis</i> Trev.	78
Tabela 5.5: Experimentos de extração de <i>Lippia dulcis</i> Trev. em meio supercrítico.	79
Tabela 5.6: Composição dos extratos de <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	88
Tabela 5.7: Resultados das análises dos extratos de <i>Lippia dulcis</i> por CLAE (254nm).	95
Tabela 5.8: Análises por CLAE das frações coletadas nos experimentos (205nm).	100
Tabela 5.9: Análises por CLAE das frações coletadas nos experimentos (254nm).	101
Tabela A.1: Dados obtidos por CLAE para os padrões de hernandulcin (205nm).	118

Tabela A.2: Dados obtidos por CLAE para os padrões de hernandulcin (254nm).....	119
--	-----

ABREVIATURAS E SIGLAS

b.u.	Base úmida
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG (<i>GC</i>)	Cromatografia a Gás (<i>Gas Chromatography</i>)
CLAE (<i>HPLC</i>)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC/MS	Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massa (<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
DIC (<i>FID</i>)	Detector de Ionização de Chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
DTP	Distribuição do Tamanho de Partículas
EM (<i>MS</i>)	Espectrometria de Massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
ESC	Extração Supercrítica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PDA	Detector de barra de diodo (<i>Photodiode Array</i>)
RMN-H ⁺	Ressonância Magnética Nuclear de próton (H ⁺)
R _t	Tempo de retenção (<i>Retention time</i>)
R _f	Fator de retenção (<i>Retention factor</i>)

SÍMBOLOS

ε	Porosidade do leito [u.a.]
ρ_a	Massa específica aparente de sólidos [g/cm ³]
ρ_r	Massa específica real de sólidos [g/cm ³]
ρ_{CO_2}	Massa específica do CO ₂ [g/cm ³]
Q_{CO_2}	Vazão volumétrica de CO ₂ [cm ³ /min]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
3.1	ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS	34
3.2	MATRIZ VEGETAL: <i>LIPPIA DULCIS</i> TREV.	35
3.3	HERNANDULCIN	36
3.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS	38
3.4.1	HIDRODESTILAÇÃO	39
3.4.2	EXTRAÇÃO EM MEIO SUPERCRÍTICO	40
3.5	FRACIONAMENTO DE EXTRATOS NATURAIS	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	MATRIZ VEGETAL	46
4.2	PRÉ-TRATAMENTO DA MATRIZ VEGETAL	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	48
4.3.1	DETERMINAÇÃO DA MASSA ESPECÍFICA REAL DAS PARTÍCULAS (ρ_r), DA MASSA ESPECÍFICA APARENTE (ρ_a) E DA POROSIDADE DO LEITO (ϵ)	48
4.3.2	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA	49
4.4	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	50
4.4.1	EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	50
4.4.2	EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	51
4.5	PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	54
4.5.1	FRACIONAMENTO UTILIZANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO	54
4.5.2	CLAE EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA	56
4.6	SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DE HERNANDULCIN	57
4.7	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	60

4.7.1	CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (FID) E CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (MS)	60
4.7.2	CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ACOPLADA À DETECÇÃO DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (FID) E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)	64
4.7.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC/MS)	65
4.7.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	65

5 RESULTADOS **68**

5.1	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	68
5.2	SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DE HERNANDULCIN	69
5.3	EXTRAÇÃO DE <i>LIPPIA DULCIS</i> E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS	78
5.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO	97
5.4.1	ADSORÇÃO E DESSORÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	97
5.4.2	CLAE EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA	104

6 CONCLUSÕES **107**

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS **110**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **111**

APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE HERNANDULCIN PARA CLAE **118**

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS CG/MS E ESPECTROS DE MASSAS DOS PADRÕES ANALÍTICOS ANALISADOS **133**

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, extratos naturais e seus compostos ativos encontram aplicação nas áreas farmacêutica, alimentícia, química, cosmética e de perfumes. Apesar do estudo desses produtos e suas aplicações não ser algo recente, a cada dia surgem novos interesses pelas substâncias presentes nesses óleos, geralmente com propriedades valiosas. Essa área ainda carece de estudos investigativos que apontem os métodos mais adequados de extração e os potenciais de uso de extratos e compostos naturais, de acordo com a matéria-prima, aplicação, região de produção, entre outros fatores.

Dentre os métodos mais conhecidos e aplicados para a obtenção de óleos essenciais está a hidrodestilação, a qual é tradicionalmente utilizada para essa finalidade. No entanto, esse processo apresenta desvantagens como o emprego de alta temperatura, o que pode incorrer na degradação de compostos termolábeis e formação de outros compostos. Ainda, é um processo que geralmente apresenta baixos rendimentos de produto final e com o qual os compostos não voláteis não podem ser obtidos.

Outro método adotado para a obtenção de extratos naturais é a utilização de solventes orgânicos. Porém, apresenta limitações, pois demanda uma etapa posterior de separação do solvente, o que pode elevar os custos de produção, além da possibilidade de contaminação ambiental pelo uso de solventes orgânicos e da provável presença de resíduos desses solventes no produto final, restringindo a sua aplicação de acordo com o produto desejado.

A extração de compostos naturais é um dos campos mais estudado da aplicação de fluidos supercríticos. Esse método oferece vantagens pela utilização normalmente de dióxido de carbono (CO_2), um solvente inerte, altamente disponível, que após o processo é despressurizado, não deixando residual no produto da extração e pode ser recuperado. Além disso, é um processo flexível devido à possibilidade de manipulação da seletividade do fluido supercrítico e não requer a utilização de uma etapa posterior de separação do solvente.

No entanto, a utilização dos compostos naturais obtidos por qualquer dos métodos existentes geralmente requer uma etapa posterior de fracionamento. Isso porque os extratos e os óleos essenciais contêm muitas substâncias em sua composição e, na maioria das vezes, deseja-

se obter uma fração desse produto ou mesmo o isolamento do composto de interesse, quando possível. No processo de extração com CO₂ denso isso já é, em parte, possível, pois ao modificar a massa específica do solvente manipula-se a seletividade do solvente supercrítico e, com isso, a solubilidade dos compostos.

Técnicas cromatográficas são comumente empregadas no fracionamento de extratos e separação de compostos naturais. Merfort (2002) publicou uma revisão bibliográfica acerca das técnicas de análise de sesquiterpenos, classe de compostos à qual pertence o produto-alvo do presente trabalho. O autor cita metodologias envolvendo cromatografia a gás com coluna capilar enantioseletiva, para a separação de estereoisômeros de α -bisabolol, cromatografia a gás com coluna capilar acoplada à técnica de infravermelho, para a diferenciação de isômeros e, ainda, a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando coluna de fase reversa, para um pré-fracionamento, seguido por separação cromatográfica líquido-sólido por CLAE, para a obtenção de compostos com alta pureza.

Diante disso, o caráter inédito desse trabalho está na utilização da tecnologia supercrítica para a obtenção do extrato de *Lippia dulcis* Trev., planta da família das Verbenaceae, que possui como um dos principais componentes o hernandulcin, substância de aroma e sabor extremamente adocicados. Cabe ressaltar que nenhum trabalho até então publicado na literatura fez uso dessa metodologia para a obtenção desse extrato, embora a utilização de CO₂ supercrítico na extração de compostos naturais seja uma técnica bastante difundida.

As possíveis aplicações para hernandulcin vêm sendo estudadas pela comunidade científica, tais como edulcorante em alimentos, medicamentos e produtos de higiene oral. No entanto, o composto é instável em temperaturas acima de 140°C. Dessa forma, a obtenção desse produto utilizando CO₂ supercrítico pode, portanto, ser válida na busca de um produto com características mais próximas ao encontrado na planta, devido à utilização de temperaturas mais brandas no processo e a ausência de solventes orgânicos. Uma fração com alta concentração de hernandulcin de origem natural pode vir a ser um produto de alto valor agregado.

As etapas de caracterização dos extratos, síntese do composto de interesse para a obtenção de um padrão analítico e aplicação de metodologias de fracionamento foram realizadas no Laboratório de Reações e Engenharia de Processos (LRGP), na *Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques* (ENSIC), em Nancy, França, durante o período de estágio doutoral.

Para facilitar a apresentação do trabalho desenvolvido, este documento encontra-se dividido em capítulos, incluindo a Introdução (Capítulo 1), os Objetivos (Capítulo 2), a Revisão Bibliográfica (Capítulo 3), com os tópicos fundamentais para a compreensão das atividades realizadas, a metodologia de trabalho utilizada (Capítulo 4), seguido do Capítulo 5, no qual estão descritos os resultados obtidos e, por fim, o Capítulo 6, o qual possui as conclusões do trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi obter o extrato de *Lippia dulcis* Trev. por tecnologia supercrítica, caracterizá-lo e, na sequência, aplicar uma metodologia que promovesse a obtenção de uma fração com maior concentração de hernandulcin, composto edulcorante de interesse presente nessa matriz vegetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos dessa tese estão assim definidos:

- a) Caracterizar o leito de partículas formado pela matriz vegetal por meio de análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, massa específica real dos sólidos, massa específica aparente do leito, porosidade do leito e distribuição de tamanhos das partículas que formam o leito;
- b) Determinar as condições adequadas de extração (pressão e temperatura) de *Lippia dulcis* Trev. em meio supercrítico, na unidade piloto instalada no Laboratório de Controle de Processos;
- c) Avaliar a composição química dos produtos obtidos por extração em meio supercrítico por meio de cromatografia a gás e cromatografia líquida;
- d) Extrair o óleo essencial de *Lippia dulcis* Trev. por hidrodestilação tipo Clevenger para servir de comparação com o extrato obtido no processo em meio supercrítico;
- e) Comparar os resultados de rendimento e composição obtidos para o produto da extração em meio supercrítico com aqueles do óleo extraído por hidrodestilação e com os dados disponíveis na literatura;
- f) Sintetizar a substância hernandulcin, de maneira a obter um padrão analítico, tendo em vista que este não está disponível comercialmente;

- g)** Analisar o composto sintetizado por cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida e RMN- H^+ , de modo a verificar o resultado da síntese;
- h)** Aplicar o método de adsorção e dessorção com CO_2 supercrítico, desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Ecole National Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), em Nancy, França, para o fracionamento do extrato obtido com CO_2 supercrítico;
- i)** Caracterizar as frações obtidas por cromatografia a gás e cromatografia líquida;
- j)** Identificar a fração do extrato que contém a maior concentração de hernandulcin; e
- k)** Utilizar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa para obter a fração de hernandulcin disponível no extrato de *Lippia dulcis*, como método alternativo ao fracionamento com CO_2 supercrítico.

A seguir, no Capítulo 3, é apresentada uma revisão bibliográfica com os principais fundamentos teóricos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo contém uma breve revisão bibliográfica acerca dos processos de extração de compostos naturais, em especial com a utilização de fluido supercrítico. Como o objeto de estudo desta tese é o composto edulcorante hernandulcin, alguns tópicos de interesse sobre essa substância e a matriz vegetal de origem também são apresentados. Ainda, uma abordagem sobre processos de fracionamento de extratos e separação de compostos está elucidada.

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS NATURAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos, insolúveis em água. Também podem ser chamados de óleos etéreos ou óleos voláteis. Possuem solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar essas soluções, chamadas de hidrolatos. Em geral, os óleos essenciais não são produtos muito estáveis, podendo sofrer alterações devido à presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES e SPITZER, 2001). Estão presentes nas plantas aromáticas e podem apresentar atividade atraente, repelente, ou mesmo tóxica a insetos e microorganismos (EMBRAPA, 2004).

O óleo essencial é produzido principalmente nas folhas a partir do metabolismo secundário das plantas, de acordo com a sua constituição genética e em resposta aos fatores ambientais de onde é cultivada (YAMAMOTO, 2006).

Segundo Reverchon e De Marco (2006), os óleos essenciais são formados, principalmente, por hidrocarbonetos, terpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados. Podem ser extraídos de raízes, flores e folhas de plantas.

A estação do ano e o tempo de exposição à luz solar podem ser determinantes na presença de determinados compostos na planta, pois algumas dessas substâncias se acumulam por um determinado período como resposta às mudanças ambientais. Portanto, plantas colhidas em épocas distintas no ano podem conter compostos diferentes com outras atividades biológicas (KAMATOU *et al*, 2008).

Kamatou *et al.* (2008) avaliaram a composição do óleo essencial de três espécies de *Salvia* spp., assim como a toxicidade e a atividade biológica em diferentes estações do ano. Os autores verificaram que houve variação no rendimento de óleo essencial em função da estação de colheita.

Silva *et al.* (2003) avaliaram o teor de óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) de acordo com a época de colheita da planta, sendo que as plantas colhidas no verão apresentaram 170% a mais de óleo do que aquelas colhidas no inverno.

3.2 MATRIZ VEGETAL: *Lippia dulcis* Trev.

O gênero *Lippia* inclui cerca de 200 espécies de plantas. Essas espécies estão distribuídas principalmente nos países das Américas Central e do Sul e, também, na região tropical do continente africano (PASCUAL *et al.*, 2001).

Lippia dulcis Trev. é uma planta medicinal da família Verbenaceae, originária da América Central, extremamente aromática, com folhas e flores de sabor adocicado intenso. Essa planta era utilizada desde a época dos Astecas no tratamento de tosse, bronquite, cólicas, asma e retenção urinária (SOUTO-BACHILLER *et al.*, 1997). A Figura 3.1 apresenta uma foto de um exemplar da planta *Lippia dulcis* Trev, idêntica àquela utilizada neste trabalho.



Figura 3.1: *Lippia dulcis* Trev.

Fonte: <http://florawww.eeb.uconn.edu>. Acesso em: 01/11/2010.

Alguns compostos foram identificados como constituintes do extrato dessa planta, tais como cânfora, canfeno, limoneno, α -terpineol,

α -pineno, trans-cariofileno, δ -cadineno, copaeno, α -bisabolol, (+)-4 β -hidroxi-hernandulcin e os principais, (+)-hernandulcin e (-)-*epi*-hernandulcin, entre outros (MELO, 2007; PÉREZ *et al.*, 2005; KANEDA *et al.*, 1992; SOUTO-BACHILLER *et al.*, 1997 e COMPADRE *et al.*, 1985).

Esses trabalhos publicados evidenciam a presença de um composto majoritário, (+)-hernandulcin, no extrato dessa matriz vegetal, o qual é responsável pelo sabor e aroma extremamente doces conferidos a essa planta. Nas pesquisas realizadas por Pérez *et al.* (2005), Kaneda *et al.*, (1992), Souto-Bachiller *et al.* (1997) e Compadre *et al.* (1985), esses autores relataram também a presença de um isômero do composto majoritário, (-)-*epi*-hernandulcin, o qual não possui as mesmas características edulcorantes conferidas ao seu análogo.

3.3 HERNANDULCIN

Hernandulcin é um composto químico, da classe dos sesquiterpenos, de sabor e aroma intensamente doces, isolado pela primeira vez por Compadre *et al.* (1985) a partir de folhas e flores de *Lippia dulcis* Trev. cultivada no México. Nesse mesmo trabalho, os autores avaliaram a substância por um painel sensorial e concluíram que este tem poder edulcorante cerca de 1000 vezes superior à sacarose, em base molar. A estrutura química de hernandulcin foi definida por esses autores como 6-(1,5-dimetil-1-hidroxi-hex-4-enil)-3-metil-ciclohex-2-enona.

A Figura 3.2 apresenta as estruturas moleculares do edulcorante hernandulcin e seu isômero, *epi*-hernandulcin.

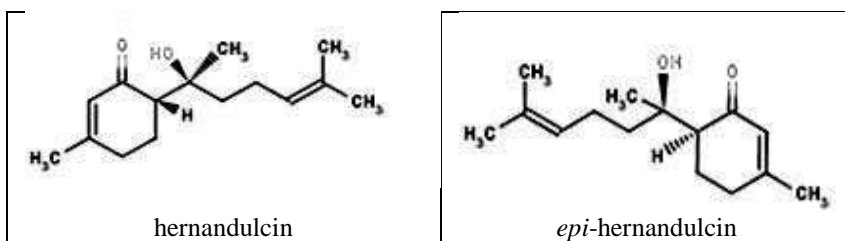


Figura 3.2: Estruturas moleculares de hernandulcin e seu isômero, *epi*-hernandulcin.

A Tabela 3.1 apresenta as características do composto (+)-hernandulcin e de seu estereoisômero, (-)-*epi*-hernandulcin relatadas na literatura.

Tabela 3.1: Características dos compostos hernandulcin e seu isômero, (-)-*epi*-hernandulcin

Característica/Parâmetro	(+)-hernandulcin	(-)- <i>epi</i> -hernandulcin
Número CAS	95602-94-1	95672-95-0
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
Massa molecular	236,35 g/mol	236,35 g/mol
Ponto de ebulição	125°C	130°C
Apresentação	Óleo transparente	Óleo transparente
Sabor/aroma	Doce	Não possui sabor e/ou aroma doce

Fonte: Adaptado de Compadre *et al.*, 1987; Souto-Bachiller *et al.*, 1997; e <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>, acesso em 01/11/2010).

Compadre *et al.* (1985) sintetizaram a forma racêmica de hernandulcin por condensação aldólica. Nessa síntese os autores utilizaram os compostos relacionados na Figura 3.3, 3-metil-2-ciclohexenona (Figura 3.3a) e 6-metil-5-hepten-2-ona (Figura 3.3b) como reagentes, obtendo em uma razão de 95:5 de (±)-hernandulcin e de seu estereoisômero (±)-*epi*-hernandulcin, respectivamente. Hernandulcin é um composto termossensível, dissociando-se em seus precursores quando aquecido a 140°C (COMPADRE *et al.*, 1987).

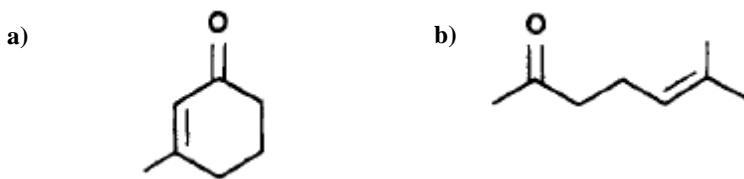


Figura 3.3: Precursores de hernandulcin e, também, seus produtos de degradação: a) 3-metil-2-ciclohexenona; b) 6-metil-5-hepten-2-ona.

Mais tarde, Mori e Kato (1986) sintetizaram o composto (+)-hernandulcin e seus quatro diastereoisômeros a partir de enantiômeros de limoneno, tendo como base os dados apresentados por Compadre *et al.* (1985). Os autores sugeriram a configuração de hernandulcin como sendo (6S, 1'S). No mesmo estudo, os autores sugeriram que a configuração do isômero fosse (6R, 1'S). Os análogos de hernandulcin

não apresentaram sabor doce. Outros procedimentos acerca da síntese de hernandulcin foram publicados (KINGHORN e SOEJARTO, 2002).

Compadre *et al.* (1987) detalharam os experimentos conduzidos para isolar o composto (+)-hernandulcin e caracterizá-lo. A partir do extrato das folhas e flores de *Lippia dulcis* Trev., obtido com éter de petróleo, os autores alcançaram um rendimento total de 0,004% m/m de hernandulcin, em relação ao material seco. Os autores identificaram também o seu isômero, (-)-*epi*-hernandulcin.

Kaneda *et al.* (1992) extraíram (+)-hernandulcin das folhas e flores de *Lippia dulcis* coletada no Panamá e obtiveram maior rendimento mássico do produto (0,154% m/m) em comparação àquele reportado por Compadre *et al.* (1987) para o exemplar coletado no México. O referido grupo identificou ainda o sesquiterpeno (+)-4 β -hydroxyhernandulcin, outro composto edulcorante presente no extrato de *Lippia dulcis* Trev., porém em menor quantidade (0,0008% m/m) do que (+)-hernandulcin.

Souto-Bachiller *et al.* (1997) avaliaram a composição do extrato de *Lippia dulcis* Trev. obtido por microextração sólido-líquido, na qual utilizaram diclorometano como solvente. A concentração de hernandulcin foi de 36%. Os autores também identificaram o isômero desse composto, (-)-*epi*-hernandulcin, correspondendo a 22% da composição do extrato.

Nayal (2009) avaliou o teor de hernandulcin no extrato alcóolico de *Lippia dulcis* e verificou que a composição desse composto situou-se entre 10,1 e 30,6%, variação esta dependente da época de colheita e região de cultivo.

Kinghorn *et al.* (1989) patentearam o composto hernandulcin como edulcorante não calórico. Entretanto, segundo Kinghorn e Soejarto (2002), o composto possui desvantagens quando usado para essa finalidade, sendo parcialmente solúvel em água e quando aquecido se decompõe em cetonas.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

Óleos essenciais são obtidos, tradicionalmente, por hidrodestilação. Esse é o método definido pela Farmacopéia Brasileira para a obtenção desses produtos. Outros processos utilizados para a obtenção de extratos naturais e de óleos essenciais são: enfloração (*enfluerage*), prensagem a frio, extração com solventes orgânicos e

extração com CO₂ supercrítico. Segundo Gaspar *et al.* (2000), óleos de qualidade superior, livres de produtos de hidrólise e de degradação térmica, podem ser isolados utilizando CO₂ supercrítico como solvente.

Os métodos adotados nesse trabalho para a extração de *Lippia dulcis* foram a hidrodestilação e a extração em meio supercrítico, utilizando CO₂ como solvente. Dessa forma, somente essas duas metodologias estão descritas neste item.

3.4.1 Hidrodestilação

É um processo bastante simples, mas que possui algumas desvantagens como a degradação térmica dos produtos, a hidrólise e a solubilização de alguns compostos em água, capazes de alterar o perfil de sabor e aroma do óleo essencial (ROY *et al.*, 1996; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Segundo Reverchon (1997), existe interesse na substituição dos processos tradicionais de extração de óleos essenciais. A presença de compostos termolábeis, a solubilização das substâncias em água e o baixo rendimento obtido são fatores preocupantes quando se pretende reproduzir fragrâncias naturais.

Hidrodestilação é o processo convencional de extração de óleos essenciais, podendo ser realizado por dois métodos: destilação tipo *Clevenger* e por arraste de vapor. Na destilação tipo *Clevenger*, a matriz a ser tratada é colocada em contato com a água. O aquecimento até a ebulição provoca a formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis. Após a condensação, esses compostos separam-se da água por decantação. Na destilação por arraste de vapor de água, este atravessa a matriz, arrastando os componentes voláteis, sendo a separação do óleo realizada de forma similar ao processo *Clevenger* (BERNARDO-GIL *et al.*, 2002). Ilustrações dos equipamentos utilizados normalmente na hidrodestilação estão apresentadas nas Figuras 3.4 e 3.5.

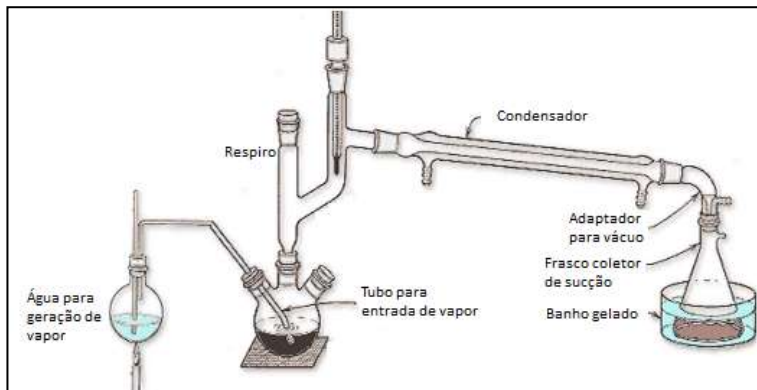


Figura 3.4: Aparelho para arraste de vapor de água.

Fonte: Adaptado de Ramos, 2007.

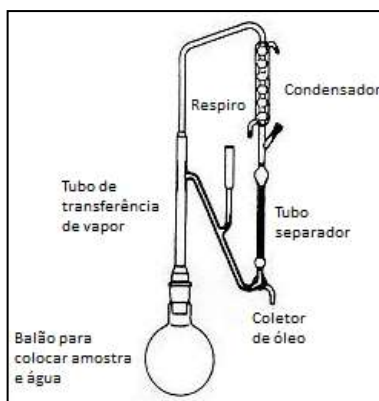


Figura 3.5: Aparelho tipo *Clevenger*.

Fonte: Adaptado de Ramos, 2007.

3.4.2 Extração em meio supercrítico

Com algumas exceções na indústria petroquímica, a aplicação de fluidos supercríticos se concentrou ultimamente na extração e fracionamento de compostos naturais, para as indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, segundo Perrut (2003) e Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007).

A separação de compostos químicos e frações de petróleo, além da extração de produtos naturais com fluidos sub e supercríticos, constituíram o objeto de desenvolvimento do método da extração supercrítica, que começou a ser estudada na década de 50 por grupos de pesquisadores da antiga URSS, EUA e Alemanha. No final da década de 60, surgiram várias patentes de processos utilizando fluidos supercríticos como solventes de extração de aromas e lipídios (BERNARDO-GIL *et al.*, 2002). No entanto, somente no final da década de 70, o uso de fluidos supercríticos teve uma aplicação comercial, na remoção da cafeína de grãos de café na Alemanha (KING e BOTT, 1993). Muitas unidades industriais estão em operação nos Estados Unidos e na Europa, atuando na extração e fracionamento de café, chá, temperos e aromas. Nos EUA, em 1985, a Kraft General Foods, divisão *Maxwell Coffee House*, instalou uma unidade de descafeinização em Houston, Texas (McHugh e Krukoni, 1994).

Segundo Rosa e Meireles (2005), a extração com fluido supercrítico encontra muitas aplicações no processamento de produtos naturais nos países da América do Sul, principalmente devido à rica biodiversidade existente nesses países.

Existem inúmeros trabalhos publicados na literatura a respeito da utilização de fluidos supercríticos para diversas aplicações. A seguir, é apresentada uma breve revisão do assunto, com enfoque na aplicação de fluido supercrítico para a obtenção de compostos naturais. Um aprofundamento do assunto pode ser encontrado nos trabalhos publicados por Brunner (1994), McHugh e Krukoni (1994), Reverchon (1997), Reverchon e De Marco (2006) e Pourmortazavi e Hajimirsadeghi (2007).

O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado na extração de compostos naturais por ser atóxico e permitir a operação do sistema sob pressões relativamente baixas e temperaturas próximas à ambiente (REVERCHON, 1997). A temperatura e pressão críticas do CO₂ são, respectivamente, 31,06°C e 73,8bar. Outras vantagens da utilização do CO₂ supercrítico como solvente residem no fato de que este é apolar, não inflamável, quimicamente inerte, disponível e de baixo custo, o que proporciona a obtenção de produtos de alta qualidade e pureza, já que não existe contaminação por solventes orgânicos e nem degradação dos compostos termolábeis. A Figura 3.6 apresenta o diagrama de fases para o CO₂, no qual a partir do ponto crítico (CP) existe uma única fase, correspondendo ao estado supercrítico desse composto.

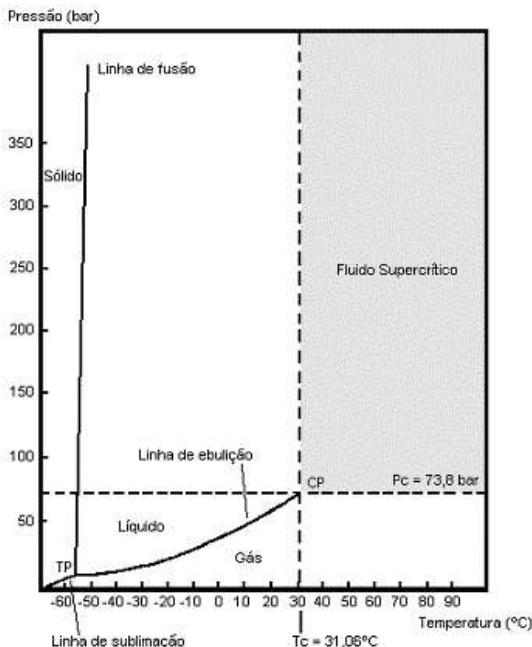


Figura 3.6: Diagrama de fases do dióxido de carbono, indicando o ponto crítico. Fonte: Sanders, 1993.

A interdependência entre volume, temperatura e pressão é muito importante na extração, pois as propriedades dos compostos supercríticos sofrem grande variação com as condições de estado e essas variações servem de base para muitas aplicações (BRUNNER, 1994).

Segundo Reverchon e De Marco (2006), a seleção das condições operacionais depende do composto a ser extraído. Os principais parâmetros de ajuste no processo são pressão e temperatura. A pressão pode ser utilizada no ajuste da seletividade do solvente. Em geral, quanto maior a pressão, maior é a capacidade do fluido supercrítico de solvatar substâncias e menor a seletividade do processo de extração. Isso porque com o aumento da pressão do sistema há um incremento da massa específica do CO₂ supercrítico e, com isso, a solubilidade dos compostos é mais elevada, aumentando o rendimento global do processo. Porém, pode favorecer a extração de compostos de maior massa molecular, muitas vezes indesejáveis no processo. Ainda segundo esses autores, a temperatura de extração de componentes termossensíveis deve ser ajustada na vizinhança do ponto crítico e no

menor valor possível, evitando, assim, a degradação térmica. O aumento da temperatura reduz a massa específica do CO₂ supercrítico, à pressão constante, diminuindo a capacidade do CO₂ de solvatar compostos. No entanto, nesta condição a pressão de vapor das substâncias a serem extraídas é maior e, com isso, a tendência desses compostos em passar para a fase fluida aumenta.

A estrutura física da matriz vegetal é de grande importância, tendo em vista que a eficiência do processo de extração está relacionada à capacidade do fluido supercrítico de se difundir na matriz. O tamanho de partícula tem papel importante na taxa de extração quando a etapa do processo é controlada pela resistência à transferência de massa interna, pois tamanhos de partículas menores permitem uma difusão mais rápida do solvente na matriz, devido ao aumento da área superficial e diminuição do caminho difusivo. No entanto, partículas muito pequenas podem provocar a adsorção do soluto já extraído na superfície da matriz ou ainda, a formação de caminhos preferenciais no leito de extração, diminuindo o contato do solvente com a matriz e, conseqüentemente, o rendimento do processo. Além disso, a produção de partículas muito pequenas pode acarretar a perda dos compostos de maior volatilidade durante o processo de moagem (REVERCHON e DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI e HAJUMIRSADEGHI, 2007).

Ghasemi *et al.* (2007) compararam os processos de hidrodestilação e extração com CO₂ supercrítico na obtenção do óleo essencial e do extrato, respectivamente, de *Artemisia sieberi*. Segundo os autores, os resultados apontaram diferença na composição química dos produtos obtidos pelos dois processos, sendo que com a adoção de parâmetros adequados de extração, a utilização de fluido supercrítico foi mais seletiva do que a hidrodestilação.

Carlson *et al.* (2001) avaliaram a extração de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) utilizando CO₂ denso, nos estados líquido e supercrítico. Os autores observaram que o processo conduzido com CO₂ líquido promoveu maior co-extração de ceras cuticulares. Enquanto que com o CO₂ no estado supercrítico, para uma determinada combinação de pressão e temperatura, o óleo essencial foi de melhor qualidade em relação à composição e menor quantidade de ceras, assim como foi possível obter boa taxa de extração, com maior rendimento no menor tempo de processo.

3.5 FRACIONAMENTO DE EXTRATOS NATURAIS

Relatos na literatura apontam a utilização de tecnologia supercrítica, acoplada ou não a técnicas cromatográficas ou outros processos de fracionamento, para a separação de compostos naturais. Yamauchi e Saito (1990) utilizaram um sistema de cromatografia supercrítica semi-preparativa para fracionar óleo de casca de limão obtido por prensagem a frio. Nesses experimentos, os autores identificaram frações do óleo compostas, principalmente, por terpenos, terpenos oxigenados e compostos de elevada massa molecular.

Galhiane *et al.* (2006) utilizaram cromatografia de adsorção com sílica-gel para purificar o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. e isolar o princípio ativo linalol. Os autores analisaram as frações com o auxílio de cromatografia a gás e verificaram que o método utilizando sílica-gel foi eficiente para concentrar o composto de interesse.

Segundo Brunner (1994), a cromatografia com fluido supercrítico pode ser utilizada como processo de separação de compostos. Num processo de separação cromatográfica, uma mistura de compostos é transportada pela fase móvel ao longo de uma fase estacionária. Entre essas fases ocorre a transferência de massa dos compostos, os quais atingem velocidades distintas ao percorrer a fase estacionária. Os componentes presentes na mistura atingem o final da coluna em tempos distintos e, portanto, são detectados e coletados separadamente. O poder solvente da fase móvel determina a distribuição dos compostos. Dessa forma, como os fluidos supercríticos têm elevado poder solvente também a temperaturas relativamente baixas, a cromatografia com fluido supercrítico pode ser uma alternativa à cromatografia a gás, a qual necessita de altas temperaturas para a evaporação da mistura de compostos e, também, uma alternativa à cromatografia líquida, a qual utiliza solventes líquidos.

Verschuere *et al.* (1992) fracionaram os extratos de lúpulo obtidos por CO₂ supercrítico com o emprego de extrações sucessivas nas quais variaram a massa específica do solvente, pela manipulação da pressão e da temperatura. Dessa forma, foi possível separar o óleo essencial da fração que continha os compostos responsáveis pelo sabor amargo do lúpulo.

Reverchon *et al.* (1994) variaram as condições de extração em meio supercrítico de folhas de *Mentha piperita* L. Ao aumentar a massa específica do CO₂, a fração de monoterpenos oxigenados diminuiu,

enquanto a de sesquiterpenos aumentou, assim como também aumentou a co-extração de ceras cuticulares.

Configurações de processos em que foram utilizadas membranas poliméricas acopladas a sistemas de extração em meio supercrítico foram pesquisadas. Dentre os trabalhos publicados nessa área, destacam-se os desenvolvidos por Sarmento *et al.* (2004) e Spricigo *et al.* (2001), que utilizaram membranas de osmose inversa para separar o óleo essencial e extrato de diversas matrizes vegetais. Segundo esses autores, o processo se mostrou bastante adequado na obtenção de frações dos extratos e na regeneração do solvente supercrítico e que, com isso, foi possível diminuir o consumo energético de recompressão do CO₂.

Alguns trabalhos relatam a utilização de métodos cromatográficos para a obtenção de compostos de alta pureza, como é o caso de isômeros. Segundo Jusforgues e Shaimi (1998), isômeros *cis* e *trans* de fitol podem ser separados por cromatografia supercrítica ao aplicar uma mistura de CO₂ e um modificador, isopropanol, como eluente.

Barth *et al.* (1994) realizaram a separação de terpenos e a eliminação de cumarinas e psoralenos provenientes do óleo da casca de limão. Utilizaram, para isso, um adsorvente polar (sílica) e dióxido de carbono supercrítico, variando a sua massa específica. Os autores caracterizaram quatro frações do óleo: fração rica em terpenos, fração desterpenada, fração com ceras, cumarinas e psoralenos e uma última fração de resíduos. Em outro trabalho, Barth *et al.* (1995) realizaram experimentos similares para dessorver o óleo de casca de bergamota (*Citrus bergamia*), também ao utilizar CO₂ supercrítico como solvente, de maneira a eliminar seletivamente terpenos e psoralenos, indesejáveis nesse produto.

A revisão bibliográfica apresentada nesse capítulo procurou elucidar os tópicos relevantes a serem considerados na condução dessa pesquisa. A seguir, no Capítulo 4 é descrita a metodologia utilizada no desenvolvimento do trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo são apresentados os procedimentos e metodologias utilizados na realização dos ensaios deste trabalho. Para tanto, foi necessário um pré-tratamento da matriz sólida vegetal, o qual consistiu na secagem, seguida de moagem. A identificação da matriz, de modo a atestar sua autenticidade, bem como a caracterização do leito utilizado nas extrações também foi realizada. O padrão do composto de interesse, hernandulcin, foi sintetizado e analisado. A seguir, são mostrados os métodos de obtenção dos extratos, sendo esses a extração em meio supercrítico e a hidrodestilação, esse último a título de comparação. Ainda, os processos de fracionamento dos produtos das extrações e, por fim, a caracterização dos extratos obtidos e de suas frações é apresentada.

4.1 MATRIZ VEGETAL

As primeiras mudas de *Lippia dulcis* Trev. foram doadas pela EPAGRI/SC para que o cultivo fosse realizado. O processo entre a definição da matriz vegetal a ser utilizada, a obtenção dos primeiros exemplares, adaptação e cultivo da planta levou cerca de 1,5 anos no prazo de realização deste trabalho. Com seu centro de origem na América Central, essa planta se adaptou bem às condições climáticas e ao solo da região da Grande Florianópolis, SC, onde foi cultivada. A matriz vegetal utilizada foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Gonçalves Salimena (ICB-UFJF), como *Phyla dulcis* (Trev.) Moldenke, da família Verbenaceae, e depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSC, sob código FLOR 36.457. As nomenclaturas *Lippia dulcis* (Trev.) Moldenke e *Phyla dulcis* (Trev.) Moldenke são sinônimos botânicos.

4.2 PRÉ-TRATAMENTO DA MATRIZ VEGETAL

A matriz vegetal foi colhida manualmente sempre no período da manhã, entre 7h e 9h, em duas épocas do ano, inverno (Junho/2008 e Julho/2008) e verão (Dezembro/2008, Janeiro/2009 e Dezembro/2009). As colheitas foram identificadas por lotes para melhor organização dos experimentos. Na Tabela 4.1 estão relacionados os lotes de *Lippia dulcis* utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Tabela 4.1: Identificação dos lotes de *Lippia dulcis* Trev.

Lote	Data de colheita	Estação do ano correspondente
1	Junho/2008	Inverno
2	Julho/2008	Inverno
3	Dezembro/2008	Verão
4	Janeiro/2009	Verão
5	Dezembro/2009	Verão

A planta foi seca em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA035) por um período de 24 a 30 horas a uma temperatura de 30°C imediatamente após a colheita. Para a medida do teor de umidade, as amostras de planta foram dispostas em estufa a 105°C \pm 1°C até peso constante. A umidade inicial da planta foi de 75% \pm 1% b.u, e a final foi de 9% \pm 0,5% b.u. As medidas foram realizadas em triplicata.

O procedimento de secagem visa minimizar as perdas das substâncias ativas, pois a partir do momento da colheita inicia-se o processo de degradação dessas substâncias devido à atividade enzimática. Adicionalmente, elevados teores de água na matriz vegetal após a colheita favorecem o desenvolvimento de microrganismos, comprometendo a atividade dos compostos ativos da planta (BARBOSA *et al*, 2006). Além disso, o volume ocupado pelo material seco no extrator é menor do que quando se utiliza a matriz vegetal úmida no processo.

A seguir, as folhas e flores secas de *Lippia dulcis* foram separadas manualmente e moídas em um moedor de facas (Marconi, SP) que possui a ele acoplado uma peneira Mesh 30 (abertura de 0,595 mm), utilizada para padronizar o tamanho das partículas. Os lotes de *Lippia*

dulcis foram armazenados em recipiente de vidro hermeticamente fechado em congelador doméstico para posterior utilização.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

A caracterização do leito de partículas, representada pela determinação de suas características físicas e morfológicas, é necessária para a avaliação das propriedades de transporte, como a porosidade do leito e a massa específica dos sólidos.

4.3.1 Determinação da massa específica real das partículas (ρ_r), da massa específica aparente (ρ_a) e da porosidade do leito (ϵ)

A massa específica real ou absoluta da matriz vegetal seca foi determinada no Laboratório Interdisciplinar de Materiais (LabMat), do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, pelo método de picnometria de gás hélio.

Nessa técnica, o gás hélio penetra nos menores poros do material sólido e nos espaços vazios entre as partículas, garantindo maior precisão. O picnômetro a gás determina o volume verdadeiro de um sólido, mesmo que poroso, por variação da pressão de gás numa câmara de volume conhecido. Para a medida utilizou-se o multipicnômetro, marca Quantachrome.

A massa específica aparente do leito de partículas (ρ_a) foi calculada por meio da medida da massa de *Lippia dulcis* suficiente para ocupar um recipiente de volume conhecido, no caso, o extrator utilizado nos experimentos em meio supercrítico, com volume igual a 147,6 cm³. Essa medida é expressa em g/cm³ e definida de acordo com a Equação (4.1).

$$\rho_a = \frac{\text{massa de } Lippia \text{ dulcis (g)}}{\text{volume ocupado (cm}^3\text{)}} \quad (4.1)$$

A porosidade total do leito (ε) de partículas de *Lippia dulcis* foi calculada utilizando a massa específica real das partículas (ρ_r) e a massa específica aparente do leito (ρ_a), conforme a Equação (4.2).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (4.2)$$

4.3.2 Análise granulométrica

De maneira a determinar a distribuição de tamanho de partículas (DTP), o produto da moagem foi classificado granulometricamente por meio de um conjunto de doze peneiras da série Tyler com abertura entre 0,000 e 2,362mm (Bertel). O conjunto de peneiras foi colocado em um dispositivo vibratório (Produtest) para realizar a classificação. O peneiramento foi conduzido por 20 minutos. A seguir, a fração retida em cada peneira foi pesada em balança analítica com precisão de 0,001 g (Gehaka, BG200). O conjunto de peneiras utilizado está apresentado na Tabela 4.2. Esse procedimento foi realizado uma única vez, visto que o moedor utilizado opera sempre nas mesmas condições e com a mesma peneira Mesh 30 (abertura de 0,595 mm) acoplada.

Tabela 4.2: Série de peneiras utilizada nos experimentos.

Malha Tyler	Abertura (mm)	Diâmetro médio de corte (mm)
8	2,362	2,362
10	1,651	2,007
14	1,168	1,410
16	0,991	1,080
24	0,701	0,846
32	0,495	0,598
48	0,295	0,395
70	0,212	0,254
100	0,147	0,180
140	0,106	0,127
200	0,074	0,090
325	0,044	0,059
Fundo	Fundo	0,022

4.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

4.4.1 Extração por hidrodestilação

Para a condução dos experimentos de hidrodestilação utilizou-se um aparato tipo *Clevenger*. A massa de sólidos foi pesada em balança analítica (Gehaka, BG200) e disposta em um balão de fundo redondo contendo, previamente, água destilada utilizada como solvente, na proporção 1:10 p/p. O balão foi conectado ao aparelho *Clevenger* e o sistema acoplado a uma manta de aquecimento para elevar à temperatura de ebulição do solvente (100°C). O sistema operou em circuito fechado por 7 horas, tempo necessário para que o volume de óleo no tubo graduado do equipamento permanecesse constante. Ao final do tempo de extração, o volume de óleo obtido foi medido na coluna graduada do aparelho e recuperado em um frasco âmbar fechado por meio da válvula existente na base da coluna, sendo armazenado sob refrigeração. O aparato experimental utilizado nesse processo de extração é idêntico ao representado na Figura 3.5 do Capítulo 3 desse documento.

Na Tabela 4.3 são apresentadas as condições experimentais utilizadas nas extrações por hidrodestilação.

Tabela 4.3: Condições experimentais utilizadas para hidrodestilação.

Experimento	m_s (g)	m_A (g)	Lote de matriz vegetal
1	30,10	300,0	1
2	30,08	300,0	1
3	30,01	300,0	1
4	30,00	300,0	3

m_s : massa dos sólidos; m_A : massa de água destilada.

4.4.2 Extração com CO₂ supercrítico

A extração com fluido supercrítico foi conduzida na unidade experimental representada na Figura 4.1. Dióxido de carbono (99,9% pureza, Linde, Brasil) foi fornecido ao sistema por meio de um cilindro conectado a um compressor tipo *booster*¹ (MaxPro Technologies, Alemanha). A unidade experimental é composta por um vaso de extração encamisado, construído em aço inox (1,8cm de diâmetro interno e 58,0cm de altura), pressurizado pelo *booster*. Um tanque pulmão encamisado foi disposto entre o *booster* e o vaso de extração, de maneira a fornecer o CO₂ na condição apropriada para extração (temperatura e pressão), além de evitar eventuais oscilações na pressão, permitindo um melhor controle.

A temperatura no tanque pulmão, assim como a do vaso de extração foi controlada por banhos termostáticos conectados às camisas dos equipamentos. Ainda, com o auxílio de um termopar tipo J (Consistec, Brasil) mediu-se a temperatura interna no tanque pulmão. A pressão em todo o processo, inclusive a de extração, foi monitorada por transdutores de pressão (AEP, Itália). As amostras foram coletadas em um separador mantido em uma faixa de pressão entre 20 e 30bar a 35°C. Desta forma, o CO₂ muda da fase supercrítica para a fase gasosa, promovendo a separação do óleo essencial. A vazão de CO₂ (L/min) foi medida na saída do separador com o auxílio de um medidor (Key Instruments, EUA).

¹ *Booster* = bomba de pistão, utilizada para elevar a pressão do CO₂ à pressão de trabalho.

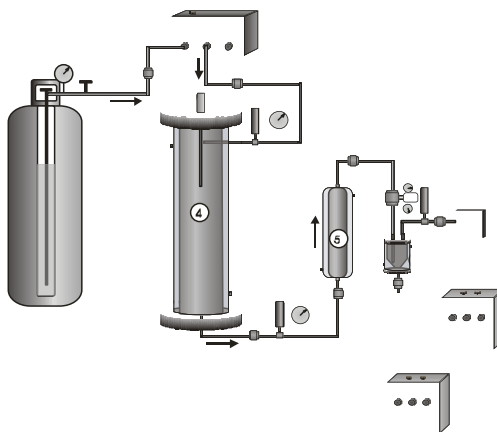


Figura 4.1: Unidade piloto de extração em meio supercrítico.

Fonte: Adaptado de Carlson *et al.*, 2001.

A vazão de CO_2 foi controlada manualmente por meio da abertura da válvula micrométrica (11) e foi medida à pressão atmosférica e temperatura ambiente por um medidor (8). A vazão de CO_2 foi estabelecida em 3,0 L/min medida na condição atmosférica (1atm e 25°C), sendo que para cada condição supercrítica (pressão e temperatura) há uma vazão correspondente de CO_2 nessas condições. Na Tabela 4.4 são apresentadas as condições experimentais utilizadas. Cada ensaio foi conduzido por um período de 100 a 270 min, até que não fosse mais possível recuperar o extrato.

Inicialmente, realizaram-se ensaios em regime contínuo, com coletas desde os instantes iniciais da extração. No entanto, a quantidade máxima de extrato obtida foi de 1,10% (massa de extrato/massa inicial de material vegetal). Desta forma, para a condução dos demais experimentos o regime em batelada foi utilizado na primeira hora do processo (60min), sendo esse um tempo de contato inicial entre a matriz vegetal e o solvente, CO_2 . Esse período foi definido arbitrariamente. Após esse tempo, o processo foi operado em regime contínuo, com a válvula redutora de pressão (6) aberta durante o restante do experimento, de maneira que o extrato precipitasse no vaso separador (7). As amostras foram coletadas em intervalos de tempo definidos, inicialmente 20 e depois 30 minutos.

O percentual de recuperação do processo foi determinado pela massa de extrato coletado em relação à massa inicial de planta alimentada no extrator. Os parâmetros avaliados nos experimentos conduzidos em meio supercrítico foram pressão e temperatura de extração e época de colheita. Os experimentos foram realizados em duplicata para a planta colhida no inverno e em triplicata para a matriz colhida no verão, devido à disponibilidade da planta.

Tabela 4.4: Condições experimentais utilizadas na extração em meio supercrítico.

Parâmetros	Variação
Pressão	100 bar
	120 bar
	140 bar
Temperatura	35°C
	40°C
Época de colheita	Inverno (Lote 2)
	Verão (Lote 3)

As Figuras 4.2 e 4.3 apresentam a variação da massa específica do CO₂ (ρ_{CO_2}) com a pressão e a temperatura, respectivamente, de acordo com Angus *et al.* (1976).

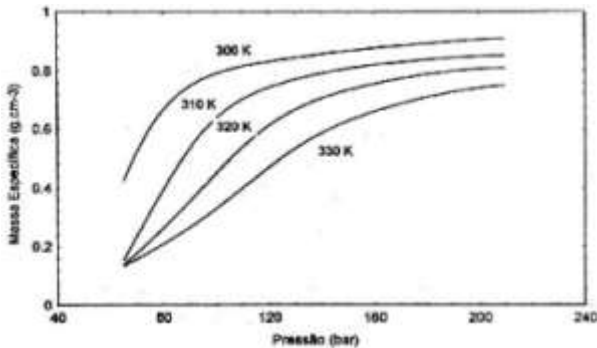


Figura 4.2: Variação da massa específica do CO₂ com a pressão (ANGUS *et al.*, 1976).

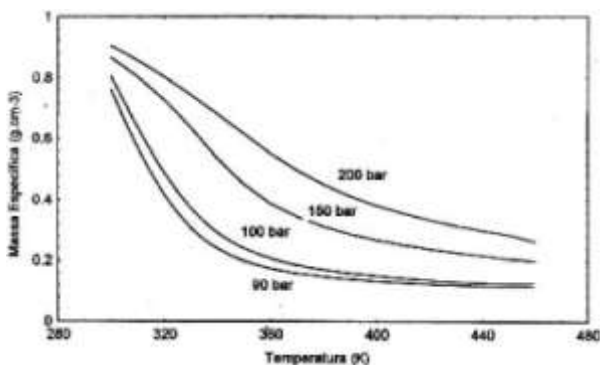


Figura 4.3: Variação da massa específica do CO₂ com a temperatura (ANGUS *et al.*, 1976).

A vazão volumétrica de CO₂ nas condições supercríticas utilizadas foi obtida a partir das massas específicas do solvente nas condições ambiente e de processo, conforme a Equação (4.3).

$$Q_{CO_2SC} = \frac{Q_{CO_2atm} \times \rho_{CO_2atm}}{\rho_{CO_2SC}} \quad (4.3)$$

Onde,

Q_{CO_2atm} = vazão volumétrica de CO₂ na condição atmosférica [cm³/min];

Q_{CO_2SC} = vazão volumétrica de CO₂ na condição supercrítica [cm³/min];

ρ_{CO_2atm} = massa específica do CO₂ na condição atmosférica [g/cm³];

ρ_{CO_2SC} = massa específica do CO₂ na condição supercrítica [g/cm³].

4.5 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

4.5.1 Fracionamento utilizando CO₂ supercrítico

A unidade piloto utilizada no processo de fracionamento com CO₂ supercrítico, construída em aço inox 304L, está esquematizada na Figura 4.4. Essa unidade está instalada na *École Nationale Supérieure*

des Industries Chimiques (ENSIC), do Institut National Polytechnique de Lorraine, em Nancy, França.

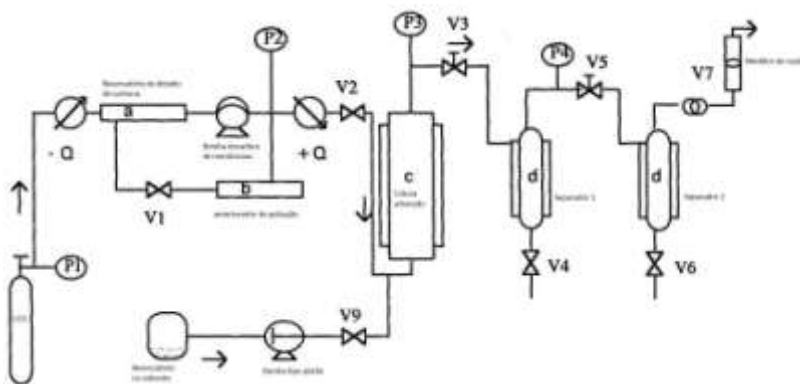


Figura 4.4: Esquema da unidade piloto de fracionamento dos extratos.
Adaptado de Chouchi, 1995.

A unidade piloto conta com o sistema de condicionamento do CO₂, um módulo de alimentação de co-solvente, uma coluna utilizada como leito de adsorção e dois separadores conectados em série. Os experimentos de fracionamento foram realizados como segue.

O extrato pré-dissolvido em uma pequena quantidade de co-solvente (n-hexano grau HPLC) é colocado em contato com o adsorvente, sílica gel 60 (0,063 – 0,200mm), Merck, previamente ativada (100°C/1h). A coluna utilizada para a adsorção (h=300mm, d.i.=23mm) é, então, preenchida com a sílica e o sistema é fechado. O co-solvente (50mL) é bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba do tipo pistão, a uma vazão de 2mL/min, por meio da abertura da válvula V9. A temperatura da coluna é mantida por meio de um banho termostático conectado à camisa da coluna. O leito contendo o adsorvente, o extrato e o co-solvente, é deixado em repouso por cerca de 15h, de maneira a promover a adsorção. Após esse período, o CO₂ na pressão supercrítica é introduzido na coluna por meio da abertura da válvula V2.

Para estar na pressão de trabalho desejada, o CO₂ proveniente do cilindro é resfriado por meio de um trocador de calor (T=273K), sendo então estocado no reservatório (a) antes de ser bombeado pela bomba dosadora de membranas (Dosapro Milton-Roy, França). Após, o CO₂ é enviado a um amortecedor de pulsação (b), seguindo para um trocador

de calor para ser reaquecido ($T=313K$) e, então, ser alimentado na coluna de adsorção.

O CO_2 permanece em contato com o leito por 60min, mantendo a válvula V3, a qual libera o fluxo para os separadores, fechada. Após, a válvula V3 é aberta e a pressão nos separadores tipo ciclone dispostos em série é ajustada para as condições de trabalho. A temperatura em cada um dos separadores é mantida por dois banhos termocriostáticos. A vazão de CO_2 para os separadores é ajustada por válvulas micrométricas instaladas após a coluna e depois de cada separador, e medida na saída da unidade piloto por um medidor de vazão (Prometron).

As coletas em cada separador foram realizadas a cada 20 ou 30 min, por meio da abertura das válvulas V4 e V6, enquanto houvesse amostra disponível para coleta. A amostra da fração de produto retido no leito foi recuperada com etanol *p.a.*, utilizando para isso uma coluna em vidro, na qual foi disposto o conteúdo da coluna de adsorção após o experimento e sobre o qual foi adicionado 100mL de etanol. A fração recuperada foi coletada na base da coluna de vidro. A Tabela 4.5 apresenta os parâmetros utilizados nos experimentos de separação. O procedimento foi realizado em triplicata.

As frações coletadas nos experimentos foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito no item 4.7.4, e por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CGMS), de acordo com a Metodologia 3 descrita no item 4.7.1 deste capítulo.

Tabela 4.5: Parâmetros experimentais de fracionamento.

Módulo	Parâmetros
Coluna de adsorção (sílica gel)	P = 80 bar T = 40°C
Separador 1	P = 80 bar T = 40°C
Separador 2	P = 25 bar T = 18°C

4.5.2 CLAE em escala semi-preparativa

O fracionamento dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência no modo semi-preparativo foi conduzido no mesmo

cromatógrafo empregado para as análises dos extratos e suas frações, citado no item 4.7.4 deste capítulo.

No entanto, foram utilizadas pré-coluna C18 (Altech) e coluna cromatográfica semi-preparativa C18 (Machery-Nagel VP250/10 Nucleosil 100-5). A vazão da fase móvel no sistema foi de 4mL/min e o volume de amostra injetado no sistema foi de 100µL. A pressão do sistema foi de 90bar. As demais condições experimentais foram as mesmas adotadas no modo analítico.

A amostra utilizada foi o extrato de *L.dulcis* obtido por extração supercrítica (120 Bar/35°C) na unidade instalada na UFSC e foi preparada em acetonitrila (ACN), utilizando o padrão interno acetofenona (ACP). A concentração da amostra injetada foi de $9,96 \times 10^{-2}$ mg_{extrato}/µL_{ACN}. O processo foi realizado em triplicata e as frações correspondentes ao composto hernandulcin analisadas por CLAE no modo analítico, conforme metodologia descrita no item 4.7.4. O extrato utilizado foi analisado também por CLAE em escala analítica previamente ao processo de fracionamento.

4.6 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DE HERNANDULCIN

A síntese e a purificação do composto de interesse, hernandulcin, foram realizadas no *Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire* (LCPM) da *École Nationale Supérieure des Industries Chimiques* (ENSIC), *Institut National Polytechnique de Lorraine* (INPL), em Nancy, França, segundo os procedimentos propostos por Compadre *et al.* (1985), Compadre *et al.* (1987) e Kim *et al.* (2003). A obtenção desse composto sintético se fez importante na realização do trabalho para que fosse possível obter um padrão analítico do composto de interesse, visto que este não está disponível comercialmente.

A forma racêmica do composto, (±)-hernandulcin, foi sintetizada por Compadre *et al.* (1985) por condensação aldólica a partir de duas cetonas comercialmente disponíveis, 3-metil-2-ciclohexenona e 6-metil-5-hepten-2-ona, que correspondem também aos seus produtos de degradação térmica, esquematizados na Figura 3.3 do Capítulo 3 deste documento.

Para tanto, adicionou-se 17,5mL (0,034mol) de diisopropilamida de lítio 2M (Aldrich) a 35mL de tetrahidrofurano anidro $\geq 99,9\%$, previamente destilado e seco (Aldrich), em um balão de fundo redondo

sob agitação magnética disposto em um banho contendo diclorometano e nitrogênio líquido. A reação foi conduzida sob atmosfera inerte de nitrogênio gasoso e a -15°C . A medida da temperatura foi realizada por um termômetro de mercúrio. A seguir, 3,74g (0,034mol) de 3-metil-2-ciclohexanona 98% (Alpha Aesar) foram adicionadas lentamente ao meio reacional, a fim de não provocar o aumento da temperatura. Agitou-se o sistema por 15 minutos e, após, acrescentou-se lentamente 4,28g (0,034mol) de 6-metil-5-hepten-2-ona 98% (Alpha Aesar). Agitou-se o sistema por adicionais 10 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 100mL de uma solução 10% de cloreto de amônia.

Transferiu-se o meio reacional para um balão de separação e adicionou-se éter dietílico (3x50mL) (J.T.Baker) para promover a separação das fases orgânica e aquosa. Após, procedeu-se com a adição de cloreto de sódio saturado. Esse procedimento foi repetido uma vez. A fase orgânica foi então recolhida em um frasco e a ela acrescentou-se sulfato de magnésio para absorver a fase aquosa residual. A mistura foi filtrada e o produto recolhido em um balão previamente pesado. A seguir, o balão foi disposto em um evaporador rotativo (Fisatom) para concentração da fase orgânica. Após a evaporação o balão foi novamente pesado, obtendo-se então 17,5g de meio reacional.

Antes de iniciar o fracionamento preparou-se uma placa de cromatografia de camada delgada (CCD) para definir a mistura de solventes a ser utilizada como eluente (fase móvel) na coluna cromatográfica, com os seguintes produtos: a) 3-metil-2-ciclohexenona (precursor de hernandulcin); b) 6-metil-5-hepten-2-ona (precursor de hernandulcin); c) extrato de *L.dulcis* obtido em meio supercrítico (120bar/ 35°C); e d) produto da reação de síntese de hernandulcin. Os produtos foram diluídos em diclorometano e eluídos em uma solução de éter de petróleo e éter dietílico (6:1). As placas foram reveladas em luz ultravioleta e em ácido fosfórico, pois nem todos os compostos são visíveis nas duas condições. Esse procedimento foi realizado de acordo com Compadre *et al.* (1987) e Kim *et al.* (2002).

O fracionamento do produto para a obtenção de hernandulcin foi realizado em uma coluna de cromatografia líquida preenchida com uma fase estacionária, sílica 70-200 μm (Grace Davison), areia *fontainebleau* (Carlo Erba) para diminuir o impacto da fase móvel na fase estacionária, éter de petróleo e éter dietílico (6:1) como eluentes (fase móvel), conforme a Figura 4.5.



Figura 4.5: Esquema e foto da coluna cromatográfica utilizada para o fracionamento do produto da síntese.

As amostras foram recolhidas em tubos de ensaio na base da coluna e analisadas em placas de CCD. A eluição das placas foi realizada com éter de petróleo e éter dietílico (1:1). As placas foram reveladas em luz ultravioleta e após em ácido fosfórico. Os fatores de retenção (R_f) para cada composto foram determinados pela relação entre a altura do ponto de retenção do composto (h_2) e aquela da área de medida de migração do eluente (h_1). Para todas as placas de CCD a referência utilizada foi o meio reacional, de acordo com a Figura 4.6.

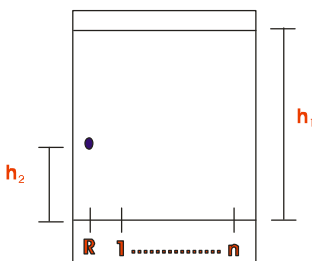


Figura 4.6: Exemplo da disposição das frações nas placas de CCD, onde "R" corresponde ao meio reacional, "1...n" as frações coletadas, h_1 = altura da área de medida da placa, h_2 = altura da retenção do composto. Sendo $R_f = h_2/h_1$.

As frações correspondentes à (\pm)-hernandulcin e à mistura dos demais compostos foram analisadas por RMN- ^1H no *Laboratoire de Chimie-Physique Macromoleculaire*, ENSIC, França. Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro BRUKER AVANCE operando a 300 MHz em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos são dados usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ($\delta = 0$ ppm para TMS).

4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

4.7.1 Cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama (FID) e Cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massas (MS)

Para a caracterização química dos extratos foram conduzidas análises de Cromatografia a Gás (CG) utilizando detector de ionização de chama (FID) e, também, um espectrômetro de massas (MS) acoplado ao equipamento. No início do trabalho, as análises foram realizadas na FURB (Fundação Universidade de Blumenau, localizada em Blumenau/SC) e, após, na UFSC, em função da aquisição dos equipamentos pelo Laboratório de Controle de Processos – LCP/EQA e pelo Laboratório de Energia e Meio Ambiente – LEMA/EQA. Posteriormente, as análises foram realizadas na *École Nationale Supérieure des Industries Chimiques* (ENSIC), do *Institut National Polytechnique de Lorraine* (INPL), em Nancy, França. As metodologias foram denominadas de 1, 2 e 3, sendo 1 aquela utilizada na FURB, 2 a que foi conduzida na UFSC e 3 aquela realizada na ENSIC.

Para a identificação do composto de interesse, hernandulcin, os espectros de massa obtidos foram comparados aos publicados na literatura e àqueles obtidos com as análises de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas, na qual foi analisado o padrão sintético de hernandulcin, e de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, na qual foi realizada a derivatização da amostra, conforme descrito nos itens 4.6.2 e 4.6.3 deste capítulo, respectivamente. Para os demais componentes dos extratos, a identificação foi possível pela consulta nos bancos de dados, pela comparação com a literatura e pela análise de alguns padrões analíticos pela Metodologia 3.

a) Metodologia 1

As amostras analisadas por CG-MS foram, previamente à análise, submetidas a um processo de “*clean up*”, ou “limpeza”, o qual consistiu em adicionar à amostra uma mistura de pentano *p.a.* e éter etílico *p.a.* (1:1), até a completa solubilização desta. Aproximadamente 100µl da amostra foram transferidos para o topo de uma micro-coluna (7cm de comprimento x 6mm de diâmetro) contendo cerca de 3cm de sílica flash pré-condicionada com a fase móvel. A coluna foi, então, eluída com 2mL da fase móvel (pentano:éter etílico) sob pressão até a total passagem da fase móvel. A solução eluída foi submetida à análise cromatográfica.

Os parâmetros analíticos utilizados nessa metodologia foram adaptados de Souto-Bachiller *et al.* (1997), autores que identificaram o composto hernandulcin e seu isômero, *epi*-hernandulcin.

b) Metodologia 2

As amostras analisadas por CG/MS e CG/FID nessa metodologia foram diluídas em clorofórmio *p.a.* (solução 5%, v/v). Os parâmetros analíticos utilizados nessa metodologia procuraram reproduzir aqueles adotados na Metodologia 1, os quais foram baseados no trabalho de Souto-Bachiller *et al.* (1997).

c) Metodologia 3

As amostras de extrato de *Lippia dulcis*, suas frações e os padrões analíticos de limoneno, cariofileno e α -bisabolol, analisados por CG/MS com essa metodologia, foram preparados em n-hexano grau HPLC (Aldrich), na concentração de 2µg/µL.

A identificação das amostras analisadas em cada metodologia consta na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Identificação das amostras analisadas por cromatografia a gás (CG/FID e CG/MS).

Metodologia	Amostras
1	AMOSTRA 1 - óleo essencial obtido por hidrodestilação (Inverno)
	AMOSTRA 2 – extrato obtido por ESC (100bar/35°C - Inverno)
2	AMOSTRA 3 - óleo essencial obtido por hidrodestilação (Verão)
	AMOSTRA 4 - extrato obtido por ESC (120bar/35°C - Verão)
	AMOSTRA 5 – extrato obtido por ESC (140bar/40°C - Verão)
3	AMOSTRA 6 – extrato obtido por ESC (120bar/35°C - Verão)
	Amostras obtidas no fracionamento com CO ₂ supercrítico.

Na Tabela 4.7 estão apresentadas as metodologias utilizadas para as análises de CG/MS e CG/FID.

Tabela 4.7: Parâmetros analíticos para CG-FID e CG-MS.

Parâmetros	Metodologia 1		Metodologia 2		Metodologia 3
	CG-FID	CG-MS	CG-FID	CG-MS	CG/MS
Equipamento	Shimadzu GC14BDIC	Varian CP3800 acoplado a um EM Saturn 2000	Shimadzu GC2010AF	Shimadzu GCMS QP2010 Plus	Shimadzu GCMS QP2010/Injetor AOC20i
Coluna capilar	OV5 (30m x 0,25mm d.i. x filme 0,25µm)	CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (30m x 0,25mm d.i. x filme 0,25µm)	Rtx5 (sílica fundida 5% difenil/95% dimetil-polisiloxano), Restek (30m x 0,25mm d.i. x filme 0,25µm)	Rtx5MS (sílica fundida 5% difenil/95% dimetil-polisiloxano), Restek (30m x 0,25mm d.i. x filme 0,25µm)	AT1701 (cianopropilfenil metilpolisiloxano), Varian (60m x 0,25mm d.i. x filme 0,25µm)
CG					
Temp. injeção	250°C	250°C	250°C	250°C	130°C
Vol. injeção	1µL	1µL	1µL	1µL	0,5 µL
Modo injeção	Split (1:20)	Split (1:50)	Split (1:10)	Split (1:10)	Split (1:50)
Gás de arraste	Nitrogênio	Hélio	Nitrogênio	Hélio	Hélio
Vazão gás	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,39 mL/min	1,39 mL/min	1,0 mL/min
Programa de temperatura	- 50°C/1min; - Até 270°C - 5°C/min por 15min	- 50°C/1min; - Até 240°C - 3°C/min	- 50°C/1min; - Até 270°C - 5°C/min por 10min; - Até 300°C - 20°C/min por 5min	- 50°C/1min; - Até 270°C - 5°C/min por 10min; - Até 300°C - 20°C/min por 5min	- 50°C/1min; - Até 230°C - 2°C/min por 10min e 15min; - Até 280°C - 5°C/min por 5min
FID					
Temp. detector	300°C		300°C		
MS					
Temp. fonte de íons		220°C		200°C	
Temp. interface		240 °C		280 °C	280 °C
Software	Peakwin 3D	Saturn GC/MS Workstation 5.1	GC Solution v.2.3, Shimadzu Corporation	GCMS Solution v.2.5, Shimadzu Corporation	GCMS Solution v.2.5, Shimadzu Corporation

4.7.2 Cromatografia gasosa (CG) acoplada à detecção de ionização de chama (FID) e espectrometria de massas (MS)

Esta análise foi realizada para a obtenção do espectro de massas de hernandulcin presente no extrato de *Lippia dulcis*. Isso porque não foi possível a obtenção do espectro desse composto pelas metodologias avaliadas no item 4.7.1. Nesse sistema a injeção da amostra é diretamente na coluna analítica, processo chamado *on-column*, não sofrendo o efeito da alta temperatura no injetor e, conseqüentemente, o composto não é dissociado em seus precursores. Ainda, como a molécula de hernandulcin é instável quimicamente, foi aplicada a técnica de derivatização da amostra por sililação, a qual consiste na substituição do hidrogênio ativo do grupo funcional da molécula, nesse caso, hidroxila (-OH), pelo grupo trimetilsilil (TMS – Si(CH₃)₃). Com isso, o composto torna-se mais estável para ser analisado, sem com isso causar rearranjos ou alterações estruturais durante a formação do derivado e, tampouco, interação com a coluna analítica.

Dessa forma, a amostra foi analisada como derivado trimetil. Em um tubo com tampa de rosca, 0,4mL de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida contendo 1% de trimetilclorosilano (BSTFA/1% TMCS, Acros Organics) foi adicionado 0,1mL da amostra (1 µg/µL) de extrato de *L.dulcis* obtido com CO₂ supercrítico (120bar/35°C). A solução foi aquecida a 60°C por 60min. Após a evaporação do solvente em um fluxo de nitrogênio seco, o resíduo foi diluído em 0,5mL de n-hexano (Aldrich Co.).

A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás (Clarus® 500 GC, Perkin-Elmer Inc., EUA) com detectores de ionização de chama e espectrometria de massas (Clarus® 500 MS, Perkin-Elmer Inc., EUA). A cromatografia gasosa foi conduzida em duas colunas capilares de sílica fundida, 14% cianopropilfenil/86% metilpolisiloxano (UptiBond 1701, 60m x 0,25mm, 0,25µm espessura do filme, Interchrom, France). As colunas foram conectadas na mesma porta de injeção *on-column*. O volume de amostra injetado foi de 0,5µL. Hélio foi usado como gás de arraste à vazão de 1,6mL/min. A programação de temperatura do forno foi de 35°C, constante por 5min, 25-290°C a uma taxa de 10°C/min e, após constante por 15min. O espectrômetro de massas operou no modo de impacto de elétrons (70eV). As temperaturas da fonte e da interface foram 250°C e 330°C, respectivamente. A detecção se deu na faixa de 35 a 400 m/z. O detector permaneceu desligado durante os primeiros 8min, tempo de eluição do solvente.

4.7.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)

Essa análise foi realizada para a obtenção dos cromatogramas e espectros de massa do composto hernandulcin sintetizado e aquele presente no extrato de *Lippia dulcis*. As análises dos extratos e suas frações foram realizadas por cromatografia líquida de alta resolução, descritas no item 4.7.4 deste capítulo. Dessa forma, fez-se necessária a obtenção e confirmação do espectro do composto com os mesmos parâmetros analíticos utilizados na técnica de CLAE.

As amostras analisadas foram preparadas em acetonitrila, utilizando também um padrão interno, acetofenona *p.a.* (ACP), na concentração de $6,68 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{ACP}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$, e seguiram o mesmo procedimento de preparo daquelas utilizadas na análise por CLAE (item 4.7.4 deste capítulo). Foi utilizada uma amostra de concentração igual a $2,32 \times 10^{-4} \text{ mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$ para o padrão sintetizado de hernandulcin e $6,07 \times 10^{-4} \text{ mg}_{\text{extrato}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$ para o extrato supercrítico de *Lippia dulcis*.

Foi utilizado para essa técnica o sistema cromatográfico CLAE Surveyor (Thermoelectron Corporation), conectado a uma bomba HPLC quaternária para LC/MS. O sistema possui amostrador automático Surveyor Plus (Thermoelectron Corporation), é acoplado a detector barra de diodo, PDA (Surveyor PDA Plus) e a um espectrômetro de massas (LQT), equipado com sonda de ionização química à pressão atmosférica (APCI), operando em modo positivo. As temperaturas de vaporização e do capilar foram de 400°C e 225°C, respectivamente. A corrente de descarga da sonda foi de 4µA. A aquisição foi realizada no modo *full scan* na faixa de 30 a 400 m/z. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna cromatográfica C18 Alltima (150 mm x 2,1 mm, tamanho de partículas 5µm) (Alltech). Acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker)/Água grau HPLC (J.T.Baker) (80:20 v/v) foi usada como fase móvel à vazão de 0,2mL/min. O sistema operou em modo isocrático. A detecção foi realizada a 254nm.

4.7.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em função da dificuldade de se realizar análises para a identificação de hernandulcin por cromatografia gasosa, adotou-se a técnica de CLAE como método para a identificação e quantificação desse composto. Embora tenha sido possível verificar e comprovar a presença desse edulcorante utilizando a técnica de derivatização da

amostra previamente à análise de cromatografia gasosa, a disponibilidade do equipamento e o tempo de análise foram determinantes na seleção do método adotado.

Dessa forma, desenvolveu-se uma metodologia de análise no sistema CLAE para a detecção e quantificação de hernandulcin, tendo como base os trabalhos realizados por Compadre *et al.* (1987) e Naya (2009).

Para as análises foi utilizado o sistema CLAE Shimadzu LC-10AT VP, equipado com detector tipo barra de diodo, PDA (Varian Pro Star), o qual foi operado em dois comprimentos de onda, 205 e 254nm. Como fases estacionárias foram utilizadas pré-coluna C18 com tamanho de partículas 5µm (Alltech) e coluna cromatográfica C18 (Varian Pursuit XRs), com tamanho de partículas 5µm e dimensões 50mm x 2,0mm. Acetonitrila grau HPLC/água grau HPLC (80:20 v/v) constituiu a fase móvel, com vazão de 1mL/min. A pressão do sistema foi de 60bar. O sistema operou em modo isocrático e o volume de injeção de amostra foi de 20µL.

As amostras foram preparadas em acetonitrila (ACN), com acetofenona (ACP) como padrão interno, na concentração de $6,68 \times 10^{-5}$ mg_{ACP}/µL_{ACN} para todas as amostras, a fim de quantificar hernandulcin pela relação entre as áreas dos picos detectados nos cromatogramas. Para o padrão de hernandulcin foi construída uma curva de calibração, descrita no APÊNDICE A deste documento. Para isso, utilizaram-se concentrações de hernandulcin na faixa de 0,0 a $5,8 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/µL_{ACN}. Para todas as amostras, tanto do padrão do edulcorante como para os extratos de *Lippia dulcis* e suas frações, foi preparada uma solução-mãe com 20µL do produto (hernandulcin sintetizado, extrato ou fração) em 3mL de acetonitrila. De cada solução-mãe 1mL foi tratado em filtro de 0,2µm (Sartorius), e uma alíquota com volume variável para obter as diferentes concentrações de hernandulcin ou igual a 100µL da solução de extrato ou fração ($6,07 \times 10^{-4}$ mg_{extrato}/µL_{ACN}) foi acrescentada à uma solução contendo 10µL da solução-mãe de acetofenona (concentração final igual a $6,68 \times 10^{-5}$ mg_{ACP}/µL_{ACN}) e o volume necessário para completar 1mL de acetonitrila.

As amostras foram avaliadas em dois comprimentos de onda, 205 e 254 nm, como anteriormente mencionado. De maneira geral, a detecção a 254nm foi mais adequada para o composto analisado, com picos mais definidos. Porém, em alguns casos isso não ocorreu. Dessa forma, todos os resultados serão dispostos no decorrer do documento.

Nesse capítulo foram apresentadas as metodologias adotadas nessa proposta de tese, de maneira a caracterizar a matriz vegetal estudada, definir as condições ideais de extração para os aparatos experimentais disponíveis e avaliar a composição química dos extratos. A seguir, no Capítulo 5, são apresentados os resultados obtidos.

5 RESULTADOS

Nesse capítulo são apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento desta tese, de acordo com os experimentos mencionados no Capítulo 4. Primeiramente, é apresentada a caracterização do leito de partículas de *Lippia dulcis* Trev. A seguir, os resultados alcançados com a síntese do composto de interesse, hernandulcin, bem como a construção da curva de calibração com esse composto para a realização das análises em CLAE. Após, são apresentados os ensaios de extração com fluido supercrítico e hidrodestilação, assim como todos os ensaios analíticos realizados nas amostras desses processos. Por fim, são mostrados os resultados dos processos de fracionamento e concentração do composto hernandulcin.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

De maneira a obter informações acerca do leito de partículas, os parâmetros massa específica real dos sólidos (ρ_r), massa específica aparente (ρ_a), porosidade (ϵ), bem como a geometria das partículas formadoras do leito, sua morfologia e distribuição foram determinadas.

Na Tabela 5.1 são apresentados os valores obtidos para massa específica real dos sólidos, massa específica aparente do leito e porosidade do leito de partículas de *Lippia dulcis*. Esses parâmetros não constam na literatura disponível e podem ser importantes para futuras aplicações dessa matriz vegetal.

Tabela 5.1: Características do leito de sólidos.

Massa específica real (ρ_r)	Massa específica aparente (ρ_a)	Porosidade (ϵ)
1,49 g/cm ³ \pm 0,01	0,47 g/cm ³ \pm 0,017	0,72

A distribuição de tamanho de partículas (DTP) está apresentada na Figura 5.1, na qual é possível observar que aproximadamente 95% das partículas se concentraram entre 0,254 e 0,395mm de diâmetro, compreendendo as peneiras com abertura entre 0,212mm e 0,295mm. A

ocorrência de diâmetros menores no peneiramento deve-se à formação de pó durante a moagem.

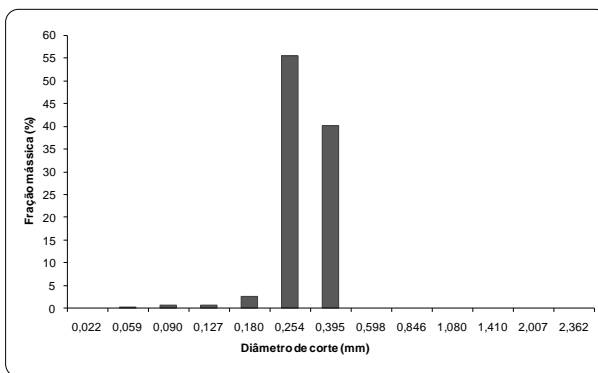


Figura 5.1: Distribuição de tamanho das partículas de *Lippia dulcis*.

Segundo Reverchon e De Marco (2006), o tamanho de partículas da matriz sólida, assim como outros parâmetros, é crucial na extração com CO₂ supercrítico. O tamanho de partículas desempenha um papel determinante nos processos de extração controlados pela resistência interna à transferência de massa, pois um menor tamanho médio de partículas reduz o caminho difusional do solvente. No entanto, se as partículas forem muito pequenas pode ocorrer a formação de caminhos preferenciais no leito de extração e, com isso, parte do solvente flui através desses canais formados, sem entrar em contato com o material a ser extraído, o que causa perda na eficiência do processo. De maneira geral, diâmetros médios de partículas entre 0,25 e 2,0mm são utilizados.

5.2 SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DE HERNANDULCIN

Os compostos obtidos na reação para a síntese de hernandulcin foram fracionados por cromatografia líquida em coluna à pressão atmosférica e isolados por cromatografia de camada delgada (CCD), conforme procedimento descrito no item 4.6 do Capítulo 4 deste documento. Os resultados de R_f (fator de retenção) de CCD obtidos estão de acordo com aqueles alcançados por Kim *et al.* (2003) e são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Identificação por CCD dos compostos obtidos na síntese e no extrato de *L.dulcis*.

Composto	Identificação	R _f	Observação
1	3-metil-2-ciclohexenona	0,36	Identificado também no extrato de <i>L.dulcis</i> analisado utilizado para comparação
2	6-metil-5-hepten-2-ona	0,74	
3	Hernandulcin	0,55	Identificado na fração pura sintetizada e no extrato de <i>L.dulcis</i> analisado utilizado para comparação

O processo de fracionamento foi realizado em duas etapas, dividindo o meio reacional em duas alíquotas para facilitar o experimento. Nesse processo foram obtidas frações, apresentadas na Tabela 5.3, sendo I à VI correspondentes à primeira parte do fracionamento e VII à X correspondendo à segunda parte. As frações II, III e V por não conterem somente um composto foram agrupadas e evaporadas em evaporador rotativo. A porção IV foi evaporada pelo mesmo processo separadamente, pois corresponde à fração de hernandulcin. As porções I e VI não foram tratadas por não conterem hernandulcin ou outro composto identificado.

Esse processo foi repetido para a segunda parte do meio reacional. Juntou-se a essa alíquota a mistura evaporada das frações II, III e V. Após, na repetição do fracionamento, foram obtidas novas porções, VII, VIII, IX e X, sendo a fração X correspondente ao produto hernandulcin puro. Essa fração foi evaporada para a remoção do solvente. A soma das massas das frações IV e X corresponde ao total de (\pm)-hernandulcin obtido na síntese (2,4g). A porção VII não foi tratada por não ter sido encontrado qualquer composto nela. As frações VIII e IX por não corresponderem a compostos puros foram agrupadas e tratadas em evaporador rotativo.

Tabela 5.3: Frações obtidas na cromatografia em coluna.

Fração	Identificação dos frascos	Composto encontrado
<i>Primeira parte do fracionamento</i>		
I	1 – 7	nenhum composto
II	8 – 14	<ul style="list-style-type: none"> • 6-metil-5-hepten-2-ona • (±)-2,8,12-trimetil-8-hidroxitrideca-2,11-dien-6-ona
III	15 – 36	<ul style="list-style-type: none"> • (±)-2,8,12-trimetil-8-hidroxitrideca-2,11-dien-6-ona • hernandulcin
IV	37 – 43	fração pura de hernandulcin
V	44 – 58	<ul style="list-style-type: none"> • hernandulcin • 3-metil-2-ciclohexenona
VI	59 – 70	outros compostos não identificados
<i>Segunda parte do fracionamento</i>		
VII	1 – 6	nenhum composto
VIII	7 – 15	<ul style="list-style-type: none"> • 6-metil-5-hepten-2-ona • (±)-2,8,12-trimetil-8-hidroxitrideca-2,11-dien-6-ona
IX	16 – 30	<ul style="list-style-type: none"> • (±)-2,8,12-trimetil-8-hidroxitrideca-2,11-dien-6-ona • hernandulcin
X	31 – 71	fração pura de hernandulcin

Na Figura 5.2 são apresentadas as placas de CCD reveladas em luz ultravioleta e em ácido fosfórico. A primeira placa de cada parte do fracionamento foi usada como referência, sendo os números 1, 2, 3 e 4, indicados na placa, relativos a: 1) precursor de hernandulcin 3-metil-2-ciclohexenona; 2) precursor de hernandulcin 6-metil-5-hepten-2-ona; 3) extrato de *Lippia dulcis*; e 4) meio reacional antes do fracionamento.

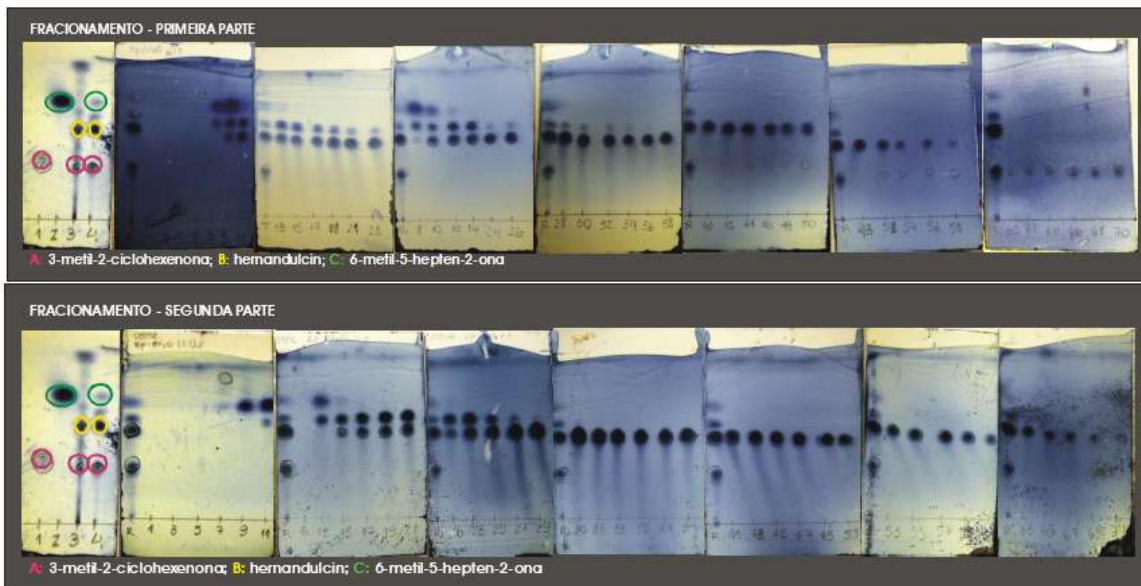
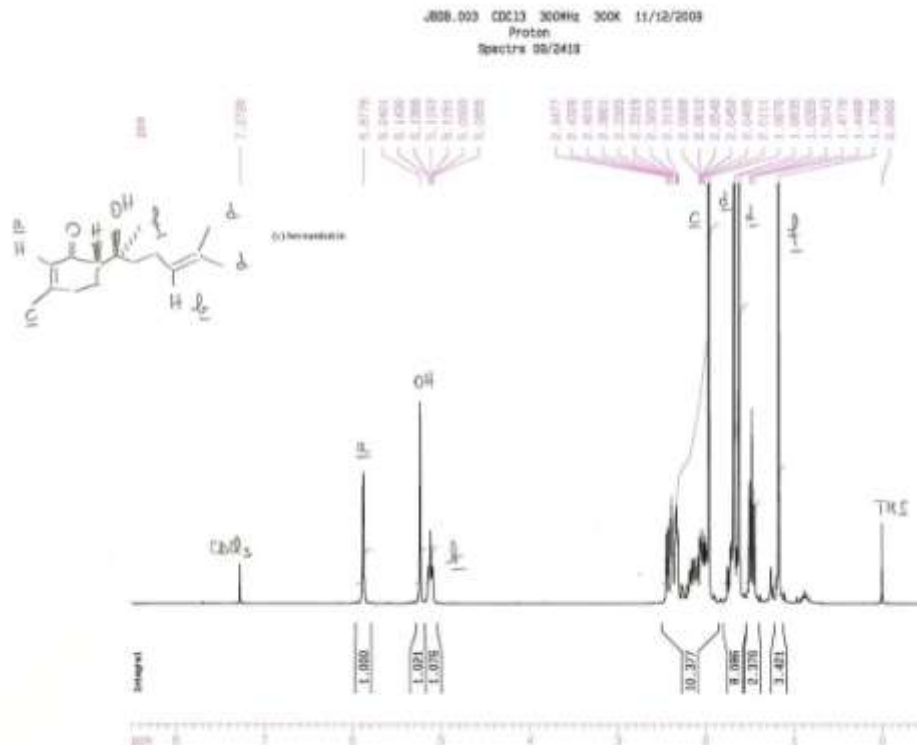


Figura 5.2: Placas de CCD correspondentes à primeira e à segunda parte do fracionamento.

As frações correspondentes à (\pm)-hernandulcin e à mistura de hernandulcin com um produto secundário de reação, (\pm)-2,8,12-trimetil-8-hidroxitrideca-2,11-dien-6-ona, foram analisadas por RMN- H^+ . Os espectros resultantes são apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com aqueles publicados por Compadre *et al.* (1987).



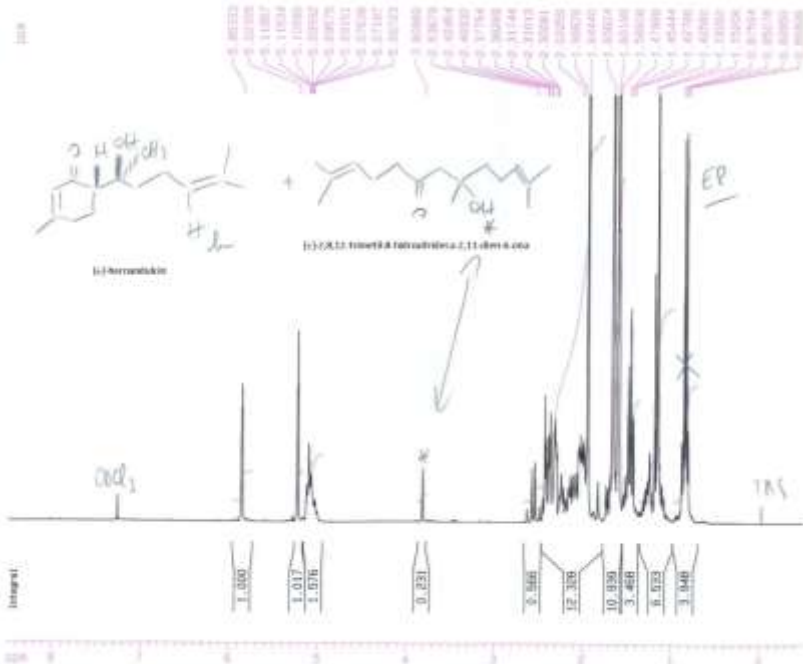


Figura 5.4: Espectro RMN- H^+ da fração contendo hernandulcin e um produto de reação secundário.

Uma amostra do padrão de hernandulcin foi analisada em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, de acordo com a Metodologia 3 descrita no item 4.7.1 do Capítulo 4 deste documento, de modo a obter o espectro de massas do composto. No entanto, houve degradação do produto em seus precursores devido à temperatura de injeção da técnica analítica. Por isso, foi adotada a cromatografia líquida com espectrometria de massas para a obtenção do espectro, conforme descrito no item 4.7.3 do Capítulo 4. E, também, em função da impossibilidade de realizar análises de cromatografia gasosa para comprovar a presença do composto de interesse, a cromatografia líquida foi a análise adotada para a avaliação da presença de hernandulcin nos ensaios de fracionamento.

Nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 são apresentados o cromatograma e os espectros do padrão interno e do padrão de hernandulcin, respectivamente. Como o modo de ionização utilizado na técnica foi *positivo*, a fragmentação do composto apresentada no espectro corresponde ao íon base ou derivado acrescido do íon hidrogênio (H^+).

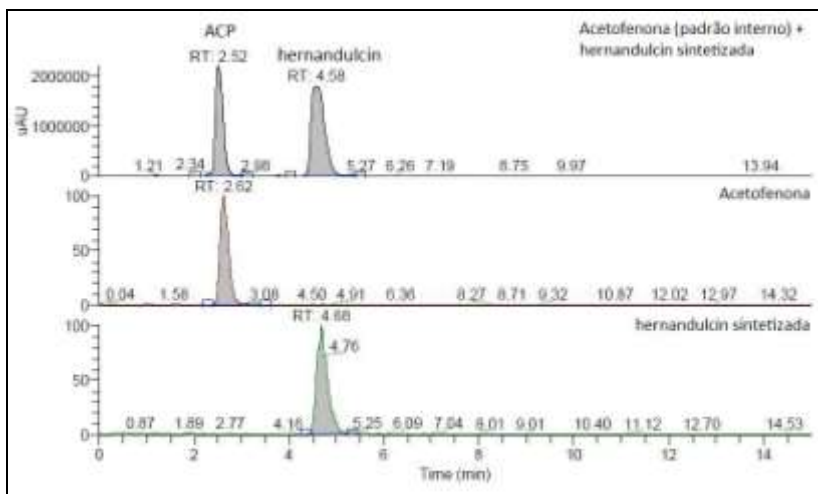


Figura 5.5: Cromatograma de hernandulcin sintetizado obtido por LCMS.

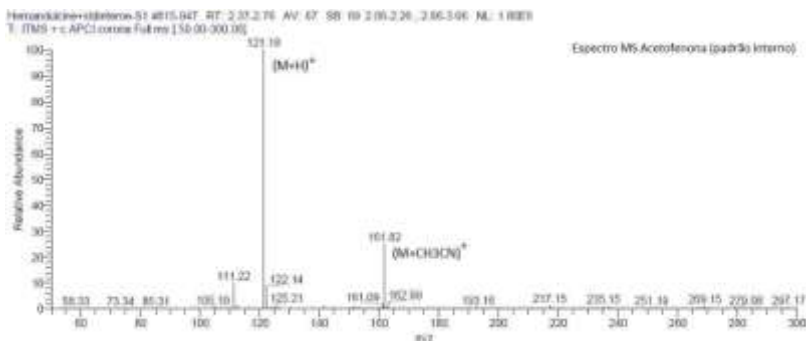


Figura 5.6: Espectro de massas de acetofenona.

Neste espectro (Figura 5.6), o pico molecular $m/z = 121,18$ corresponde ao composto acetofenona, de massa molar igual a 120 g/mol, acrescido do íon hidrogênio. Já o pico molecular $m/z = 161,82$ corresponde ao composto acetofenona acrescido da acetonitrila, de massa molar igual a 41 g/mol.

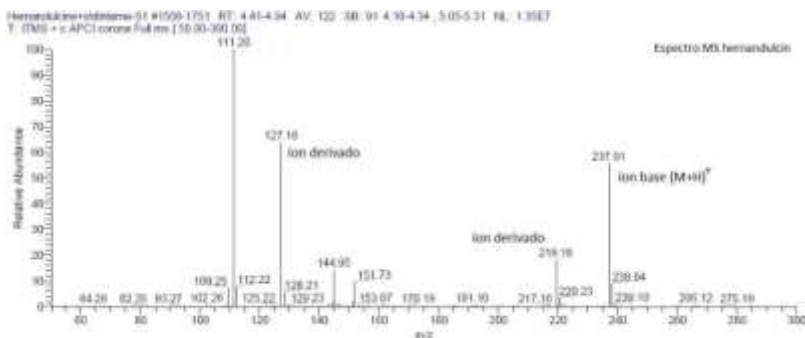


Figura 5.7: Espectro de massas de hernandulcin.

No espectro do padrão de hernandulcin (Figura 5.7), a fragmentação do composto está de acordo com o padrão de fragmentação proposto por Compadre *et al.* (1987). O pico do íon molecular $m/z = 237$ corresponde ao composto hernandulcin, de massa molar igual a 236 g/mol, acrescido de um hidrogênio (H⁺).

A partir da síntese e purificação do composto foi possível obter um padrão para as análises cromatográficas dos extratos e, com isso, comprovar a sua presença nas amostras resultantes desse trabalho. As curvas de calibração do composto para análises CLAE, construídas a

205 e 254nm, estão relacionadas no APÊNDICE A, bem como os cromatogramas obtidos.

5.3 EXTRAÇÃO DE *Lippia dulcis* E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

O processo de extração de *Lippia dulcis* em meio supercrítico realizado neste trabalho foi comparado ao método de hidrodestilação, bastante utilizado na obtenção de óleos essenciais de plantas.

Para um melhor entendimento desses resultados são apresentados, na Tabela 5.4, os experimentos de extração de óleo essencial de *Lippia dulcis* por hidrodestilação. Já na Tabela 5.5 é apresentado um resumo dos ensaios de obtenção do extrato em meio supercrítico.

Tabela 5.4: Ensaios de hidrodestilação de *Lippia dulcis* Trev.

Nº	Época do ano	T (°C)	tempo (h)	m _s :m _a	m _e /m _s (% , m/m)	ρ óleo (g/cm ³)
1	inverno	100	7	1 : 10	0,3	0,733
2	inverno	100	7	1 : 10	0,3	0,733
3	inverno	100	7	1 : 10	0,3	0,733
4	verão	100	7	1 : 10	0,6	0,792

m_s: massa inicial de sólidos; m_a: massa de água; m_e: massa extraída.

Tabela 5.5: Experimentos de extração de *Lippia dulcis* Trev. em meio supercrítico.

Nº	Época do ano	P (bar)	T _{extração} (°C)	ρ_{CO_2} (g/cm ³)	Q _{CO₂SC} (cm ³ /min)	Recuperação média extrato m _e /m _s (% , m/m)
1	inverno	100	35	0,714	-	0,8 ± 0,1
2	inverno	100	40	0,630	-	1,2 ± 0,1
3	inverno	120	35	0,768	-	1,3 ± 0,1
4	inverno	120	40	0,719	-	1,1 ± 0,3
5	inverno	140	35	0,802	-	1,5 ± 0,2
6	inverno	140	40	0,764	-	2,7 ± 0,2
7	verão	100	35	0,714	7,5	1,7 ± 0,1
8	verão	100	40	0,630	8,5	2,1 ± 0,2
9	verão	120	35	0,768	7,0	2,6 ± 0,1
10	verão	120	40	0,719	7,4	1,8 ± 0,1
11	verão	140	35	0,802	6,7	2,6 ± 0,4
12	verão	140	40	0,764	7,0	3,4 ± 0,6

É possível observar, de acordo com a Tabela 5.5, que a recuperação de extrato nos experimentos em meio supercrítico com o lote colhido no verão foi maior na comparação com as mesmas condições (pressão e temperatura) utilizadas para a planta colhida durante o inverno. O mesmo pode ser observado na Tabela 5.4 para o óleo obtido por hidrodestilação. O percentual de recuperação do processo de hidrodestilação é menor do que na extração em meio supercrítico, pois nesse processo se obtém somente a fração volátil e, no processo com fluido supercrítico o produto é o extrato, o qual contém a fração volátil e a fração com compostos de maior massa molecular (ceras cuticulares, pigmentos, entre outros).

Silva *et al.* (2003) também verificaram resultado similar para o teor de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) colhido no inverno e verão e extraído por arraste a vapor, sendo que com a planta colhida no verão o teor de óleo extraído foi maior.

Segundo Singh *et al.* (2002), nas diferentes estações do ano, de acordo com a distribuição de chuvas e de incidência de luz solar, tem-se diferentes composições para um mesmo óleo essencial.

Como essa matriz vegetal tem seu centro de origem na América Central, com clima tropical, incidência constante de luz solar e altas temperaturas, os resultados observados para o rendimento global parecem estar coerentes com a origem da planta, já que nos meses de

verão da região de cultivo é quando essas características são mais próximas às da região de onde essa matriz vegetal é nativa.

O objetivo dessa avaliação foi somente o de fixar um período de colheita para a planta usada no processo, possibilitando, assim, a obtenção de maior rendimento na extração.

A condição com a qual foi obtida maior recuperação de extrato foi de 140bar e 40°C, em média $2,7 \pm 0,2\%$ e $3,4 \pm 0,6\%$ (m/m) para inverno e verão, respectivamente. No entanto, bons resultados também foram obtidos para a condição de 120bar e 35°C, em média $1,3 \pm 0,1\%$ e $2,6 \pm 0,1\%$ (m/m), para inverno e verão, respectivamente. Ainda, a pressão de 140bar é próxima ao valor máximo para esse parâmetro na unidade piloto utilizada, sendo este um limitante do processo, pois há uma grande probabilidade de ocorrerem oscilações. Isso pode explicar os maiores desvios padrão obtidos nos experimentos em que essa pressão foi adotada.

A seguir, nas Figuras 5.8 e 5.9, são apresentadas as curvas de uma série de experimentos de extração em meio supercrítico (recuperação mássica de extrato, em % versus tempo de extração, em minutos), para os dois períodos de colheita.

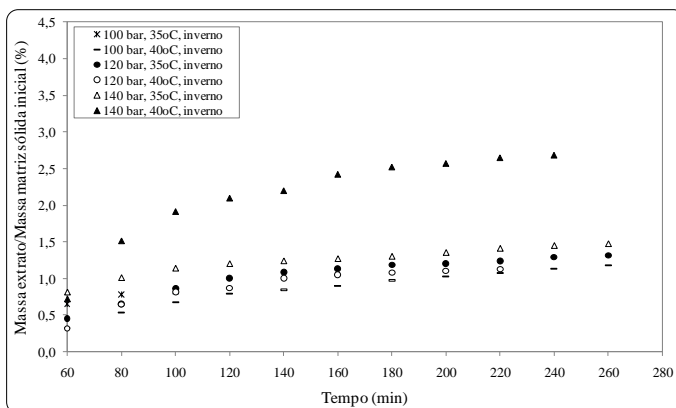


Figura 5.8: Curva de extração de *Lippia dulcis* em meio supercrítico, correspondendo ao período de inverno.

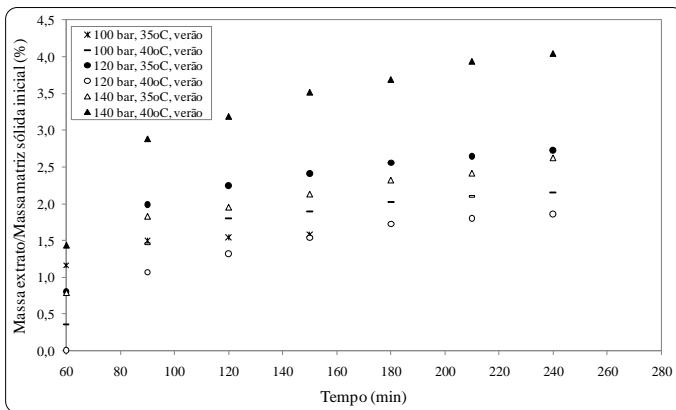


Figura 5.9: Curva de extração de *Lippia dulcis* em meio supercrítico, correspondendo ao período de verão.

É possível observar que o comportamento das curvas de extração nem sempre está relacionado à massa específica do CO_2 , visto que para o maior valor de massa específica (140bar/35°C; $\rho_{\text{CO}_2}=0,802 \text{ g/cm}^3$) o rendimento de extrato não é máximo (média de $1,5\pm0,2\%$ no inverno e $2,6\pm0,4\%$ no verão). De maneira geral, o aumento da pressão, à temperatura constante, provoca um incremento no rendimento, pois a massa específica do CO_2 é maior, solubilizando mais o material disponível para extração (Reverchon e De Marco, 2006). No entanto, a seletividade do processo diminui pelo aumento da solubilidade dos compostos no solvente supercrítico.

Gomes *et al.* (2007) observaram o mesmo comportamento para a extração supercrítica de gerânio rosa (*Pelargonium sp.*), na qual o aumento da pressão e, conseqüentemente, da massa específica do solvente, provocou um incremento no rendimento do processo. García-Risco *et al.* (2010) na extração supercrítica de tomilho (*Thymus vulgaris L.*), Macías-Sanchez *et al.* (2010) na extração de carotenóides de *Scenedesmus almeriensis* e Donelian *et al.* (2009) no estudo da extração de patchouli (*Pogostemon cablin*) também verificaram que o aumento da massa específica, ocasionado pelo emprego de pressões mais elevadas, acarretou na obtenção de maior quantidade de extrato no processo.

À 35°C tem-se um maior rendimento do processo em decorrência do aumento da pressão de 100 a 120bar, nas duas épocas do ano avaliadas. Ou seja, a solubilidade dos compostos no solvente supercrítico foi mais pronunciada. Na mesma temperatura, de 120 a

140bar, esse aumento não foi pronunciado, porém os desvios padrão obtidos a 140bar são maiores do que aqueles obtidos a 120bar. Isso pode ser devido à dificuldade da manutenção da pressão mais elevada. Embora o processo tenha sido bastante controlado, oscilações ocorrem com maior frequência nesse caso do que em pressões menores.

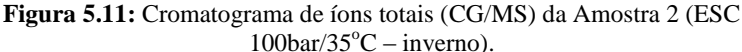
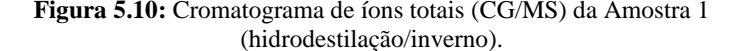
Por outro lado, à 40°C um comportamento contrário pode ser observado, com pouca variação no rendimento de 100 a 120bar e um aumento pronunciado de 120 a 140bar. O aumento da temperatura a 120bar acarretou na diminuição da massa específica do CO₂ e, portanto, reduziu o seu poder solvente. Isso explica porque os rendimentos obtidos nas extrações conduzidas a 120bar/40°C foram menores do que aqueles alcançados com 120bar/35°C, para as duas estações do ano avaliadas.

No entanto, a 100 e 140bar o aumento da temperatura de 35°C para 40°C teve um efeito positivo no rendimento da extração, embora a massa específica do CO₂ seja menor. Isso pode ter ocorrido porque ao aumentar a temperatura de extração, para uma pressão fixa, há um incremento na pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, favorecendo com isso a tendência dessas substâncias de passarem para a fase fluida, e esse efeito prevaleceu em relação à redução da massa específica do CO₂. Esse resultado também foi observado por Gomes *et al.* (2007) na avaliação do efeito da temperatura na extração em meio supercrítico de *Pelargonium sp.* e por Macías-Sanchez *et al.* (2010) na extração de carotenóides de *Scenedesmus almeriensis*.

Na avaliação dos parâmetros examinados para as condições experimentais disponíveis, a condição do processo na qual se obteve maior recuperação do extrato foi a de 140bar/40°C. A condição de 120bar/35°C também apresentou bons resultados e com menor variação entre as repetições. No entanto, a definição da condição mais apropriada para a obtenção do extrato leva em consideração a sua composição e a presença e quantidade do composto de interesse, hernandulcin.

Dessa forma, a caracterização dos extratos foi realizada por técnicas cromatográficas, conforme descrito no Capítulo 4 deste documento. Inicialmente, foram adotadas as Metodologias 1 e 2 para a caracterização dos produtos obtidos por hidrodestilação e extração em meio supercrítico, aplicando a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (FID) e espectrômetro de massas (MS).

As Figuras 5.10 e 5.11 referem-se aos cromatogramas de íons totais (CG/MS) obtidos para as amostras 1 (hidrodestilação – inverno) e 2 (extração supercrítica 100bar/35°C – inverno), respectivamente, para as quais foi utilizada a Metodologia 1. Na Figura 5.10, o pico



Na Figura 5.12 é apresentado o espectro de massa correspondente aos picos de hernandulcin dos cromatogramas de íons totais. Os resultados obtidos estão de acordo com as aqueles publicados por Souto-Bachiller *et al.* (1997) e, mais adiante neste documento, em concordância com o espectro de massas obtido para o composto neste trabalho.

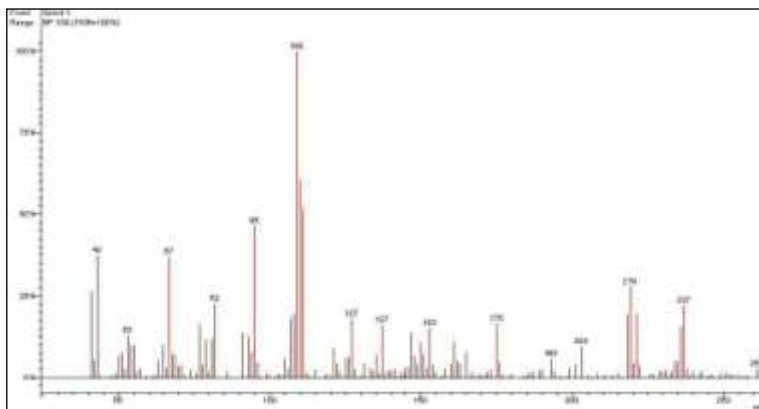


Figura 5.12: Espectro de massa do pico correspondente a hernandulcin obtido na análise de CG/MS (Metodologia 1).

As Figuras 5.13 a 5.16 referem-se aos cromatogramas de íons totais obtidos nas análises das amostras de óleo essencial (Figura 5.13) e extratos de *Lippia dulcis* resultantes do processo em meio supercrítico (Figuras 5.14, 5.15 e 5.16), realizadas com as Metodologia 2 e 3, descritas no item 4.7.1, do Capítulo 4.

Nessas análises é possível observar que houve degradação térmica de hernandulcin em seus precursores e também produtos de dissociação térmica, 6-metil,5-hepten-2-ona e 3-metil,2-ciclohexen-1-ona, representados nos cromatogramas pelos picos identificados como 2 e 3, respectivamente. Uma hipótese para que isso tenha ocorrido pode estar no fato de que a temperatura de injeção das amostras no cromatógrafo (250°C) foi maior do que a temperatura de degradação do composto (140°C) na Metodologia 2.

Segundo Compadre *et al.* (1987), quando aquecido acima de 140°C hernandulcin se dissocia nessas substâncias. Nas amostras 1 e 2, nas quais foi aplicada a Metodologia 1, é possível observar os mesmos compostos, porém em menor proporção. Esse fato pode estar relacionado à utilização de uma programação linear de temperatura de

injeção das amostras 1 e 2 no equipamento, fazendo com que o composto não se dissocie ao ingressar na coluna capilar. A ausência de um pico correspondente ao edulcorante nos cromatogramas das amostras 3, 4 e 5 sustenta essa hipótese. Já na análise da amostra 6, para a qual foi adotada uma temperatura de injeção menor (130°C) na Metodologia 3, essa degradação também foi observada. Uma possibilidade para que isso tenha ocorrido está no fato de que a dissociação térmica inicie ainda antes da temperatura de degradação. Outra hipótese seria que o produto tivesse sofrido degradação com o tempo, e não com a temperatura. Porém, isso não ocorreu, pois nas análises seguintes, em que foram adotadas outras técnicas cromatográficas, a presença do composto foi confirmada. Melo (2007) ao avaliar a composição do óleo essencial de *Lippia dulcis* por CG/MS também verificou a instabilidade térmica do composto hernandulcin na análise devido à temperatura de injeção na coluna capilar.

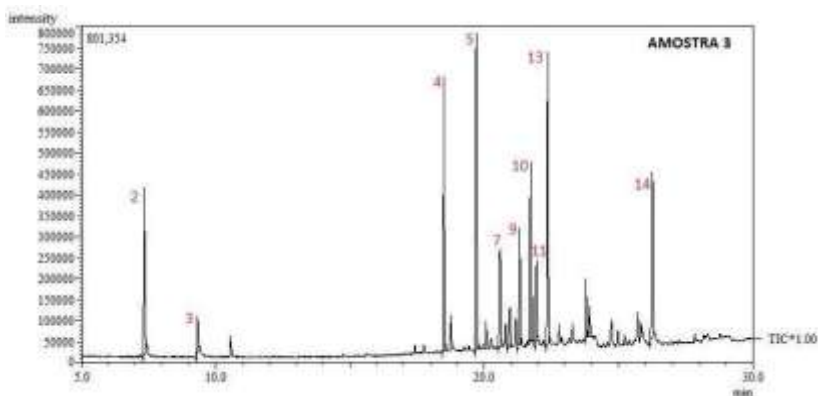


Figura 5.13: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 3 (hidrodestilação/verão).

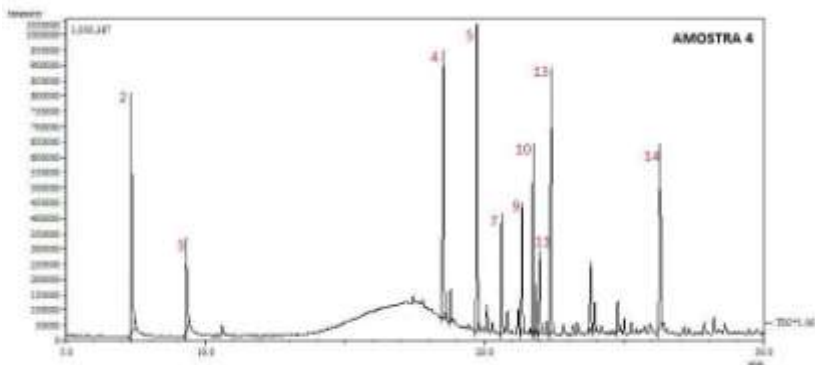


Figura 5.14: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 4 (ESC 120bar/35°C – verão).

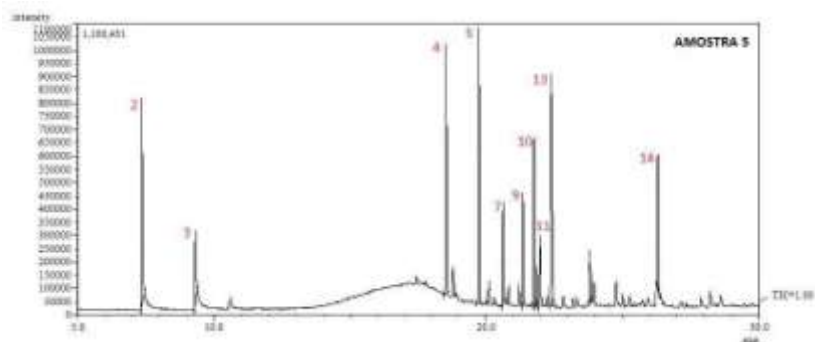


Figura 5.15: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 5 (ESC 140bar/40°C – verão).

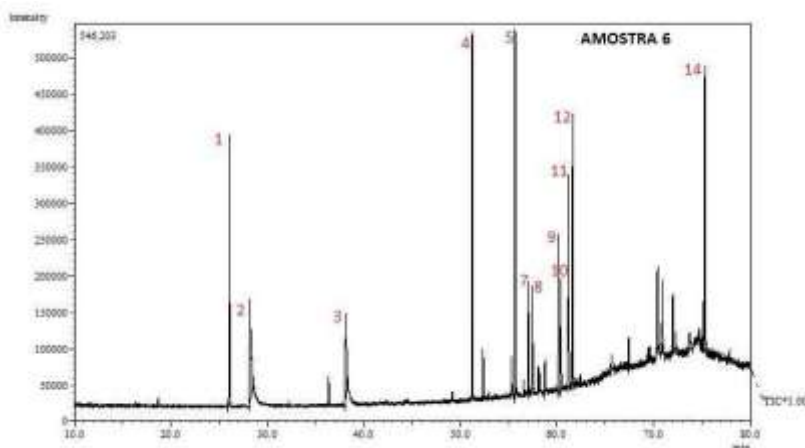


Figura 5.16: Cromatograma de íons totais (CG/MS) da Amostra 6 (ESC 120bar/35°C – verão).

Apesar da degradação térmica de hernandulcin ao utilizar essas condições de análise, a composição do óleo e do extrato parece não ter sido alterada quando comparadas as três metodologias empregadas e, também, na comparação com a literatura disponível. Na Tabela 5.6 estão relacionados os compostos identificados nos óleos essenciais e nos extratos analisados. Os compostos estão numerados de acordo com os picos correspondentes nos cromatogramas apresentados.

Tabela 5.6: Composição dos extratos de *Lippia dulcis* Trev.

Nº pico	Composto	Metodologia 1 GC/MS				Metodologia 2 GC/MS						Metodologia 3 GC/MS	
		Hidrodestilação		ESC (100bar/35° C)		Hidrodestilação		ESC (120bar/35° C)		ESC (140bar/40° C)		ESC (120bar/35° C)	
		Rt (min)	Área (%)	Rt (min)	Área (%)	Rt (min)	Área (%)	Rt (min)	Área (%)	Rt (min)	Área (%)	Rt (min)	Área (%)
1	limoneno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26.063	7.790
2	6-metil, 5-hepten-2-ona	8.912	3.221	8.911	3.894	7.342	8.030	7.346	11.480	7.358	11.190	28.201	7.440
3	3-metil, 2-ciclohexenona	11.759	1.673	11.780	3.325	9.320	2.170	9.308	5.480	9.320	4.760	38.133	4.780
4	copaeno	25.803	7.877	25.789	7.614	18.507	13.850	18.516	11.580	18.522	13.910	51.220	11.770
5	trans-cariofileno	27.632	7.844	27.618	7.753	19.710	16.890	19.720	13.870	19.725	15.870	55.669	13.110
6	cedreno	29.062	4.241	29.052	3.533	-	-	-	-	-	-	-	-
7	β-farneseno	-	-	-	-	20.600	8.310	20.613	8.240	20.618	8.470	57.017	3.410
8	β-sesquifelandreno	30.154	2.733	30.144	3.484	-	-	-	-	-	-	57.463	3.270
9	naftaleno	31.706	9.315	31.687	7.956	21.324	5.950	21.334	5.700	21.339	6.380	60.199	5.820
10	γ-elemeno	-	-	-	-	21.733	9.870	21.741	8.770	21.747	9.950	60.405	3.780
11	β-bisaboleno	-	-	-	-	21.951	3.980	21.962	3.790	21.969	3.890	61.206	7.550
12	(-)-isodenedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.634	8.990
13	δ-cadineno	-	-	-	-	22.373	15.050	22.383	12.030	22.387	13.280	-	-
14	α-bisabolol	38.185	7.499	38.157	4.565	26.275	9.910	26.285	9.880	26.288	7.750	75.331	10.150
15	(+)-hernanducina ^a	43.875	16.328	43.889	19.215	-	-	-	-	-	-	-	-
16	n.i.	-	-	43.933	12.365	-	-	-	-	-	-	-	-
17	n.i.	44.244	2.913	44.287	5.975	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		63.644		79.679		94.010		90.820		95.450		87.860	

^a identificado por comparação do espectro com a literatura

n.i.: não identificado

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.6, é possível observar que a composição do óleo essencial e dos extratos de *Lippia dulcis* se caracteriza em sua maioria pela presença de compostos sesquiterpênicos, tais como o trans-cariofileno, copaeno, δ -cadineno e α -bisabolol, tanto nas análises realizadas com as amostras de inverno e de verão. Souto-Bachiller *et al.* (1997) verificaram a presença desses compostos no extrato da planta originária de Porto Rico, porém em quantidades inferiores às encontradas nesse trabalho (trans-cariofileno 0,75%; copaeno 0,73%; δ -cadineno 0,65% e α -bisabolol 2,91%). Já Melo (2007) encontrou resultados similares aos apresentados nesse trabalho para a composição e quantidade relativa desses compostos sesquiterpênicos no óleo essencial de *Lippia dulcis* obtido por hidrodestilação assistida por microondas (trans-cariofileno 10,35%; copaeno 8,35%; δ -cadineno 8,84% e α -bisabolol 8,15%). À exceção dos produtos obtidos com as amostras coletadas no inverno e para o α -bisabolol na amostra resultante do processo supercrítico a 140bar/40°C, foram observadas quantidades relativas superiores para os compostos sesquiterpênicos na comparação com os dados publicados na literatura. É importante considerar que existem diferenças entre as metodologias de análise utilizadas com relação às referências da literatura, entre os processos de obtenção dos extratos e, também, entre as origens da planta e local de cultivo, o que pode acarretar em valores de composição distintos.

Com a análise em que foi utilizada a Metodologia 1 foi possível verificar a presença de hernandulcin, correspondendo a 16,3% relativo à área total do cromatograma para a amostra do óleo hidrodestilado, e a 19,2% para a amostra obtida por extração em meio supercrítico.

Apesar da degradação do composto de interesse, hernandulcin, na análise com as Metodologias 2 e 3, assume-se que não tenha ocorrido alterações químicas das demais substâncias identificadas em maior proporção nas amostras. Isso porque a composição dos produtos está de acordo com aquela verificada por Melo (2007) e por Souto-Bachiller *et al.* (1997). Neste último trabalho (SOUTO-BACHILLER *et al.*, 1997), os autores verificaram a presença de 36% de hernandulcin no extrato de *Lippia dulcis* originária de Porto Rico obtido com diclorometano. Os mesmos pesquisadores relataram a presença de cânfora no extrato de *L. dulcis* coletada no México. No presente trabalho foi utilizado um padrão analítico para cânfora ao aplicar a Metodologia 3, de maneira a verificar a sua presença. Esse composto não foi encontrado no extrato de *L. dulcis* avaliado nessa pesquisa.

Os cromatogramas e espectros obtidos para os padrões analíticos utilizados estão apresentados no APÊNDICE B deste documento.

Em função da ausência do pico de hernandulcin nas análises cromatográficas realizadas, procedeu-se a derivatização química com trimetilclorosilano (TMS) do extrato de *Lippia dulcis* obtido por extração com CO₂ supercrítico, conforme descrito no item 4.7.2 do Capítulo 4 deste documento. Dessa forma, a molécula de hernandulcin foi estabilizada e a detecção do derivado correspondente foi possível por cromatografia a gás. Na Figura 5.17 observa-se o pico correspondente ao derivado de hernandulcin retido em 27,77min. A confirmação foi possível por meio do espectro de massas relativo a esse pico, apresentado na Figura 5.18. A necessidade desse procedimento também foi verificada por Melo (2007), no qual o autor utilizou da derivatização química com trimetilclorosilano para identificar a presença de hernandulcin no óleo essencial de *Lippia dulcis* obtido por hidrodestilação assistida por microondas. O espectro de massas obtido nessa análise está em concordância com aquele encontrado pelo referido autor para o derivado de hernandulcin.

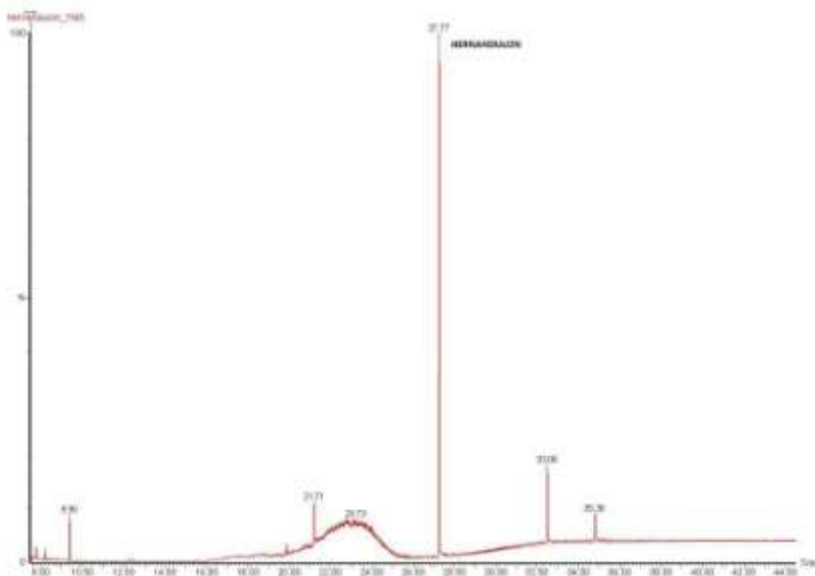


Figura 5.17: Cromatograma do composto hernandulcin derivatizado com TMS.

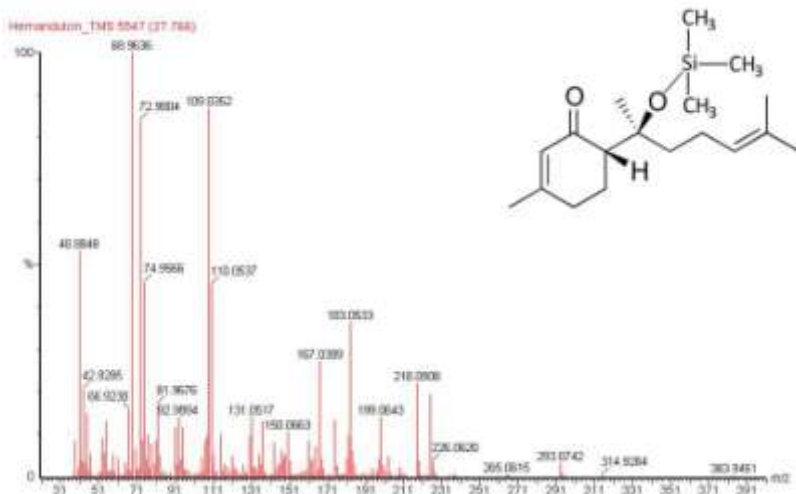


Figura 5.18: Espectro de massas do derivado de hernandulcin com TMS e a estrutura da molécula resultante.

Além da análise por cromatografia a gás para confirmar a presença do composto hernandulcin e comparar o espectro com a literatura disponível, foi realizada a análise do extrato de *Lippia dulcis* obtido com CO₂ supercrítico, bem como do padrão sintético dessa substância por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (LC/MS), de acordo com metodologia descrita no item 4.7.3 deste documento.

Na Figura 5.19 é apresentado o cromatograma da solução de extrato de *L. dulcis* contendo o padrão interno acetofenona e a comparação deste cromatograma com aquele obtido para o composto sintético, previamente mostrado neste capítulo. O composto hernandulcin foi retido em 4,58min, enquanto que o padrão interno apresentou tempo de retenção igual a 2,51min. Ao comparar com o composto sintético verifica-se que o perfil cromatográfico é bastante similar, igualmente para os tempos de retenção.

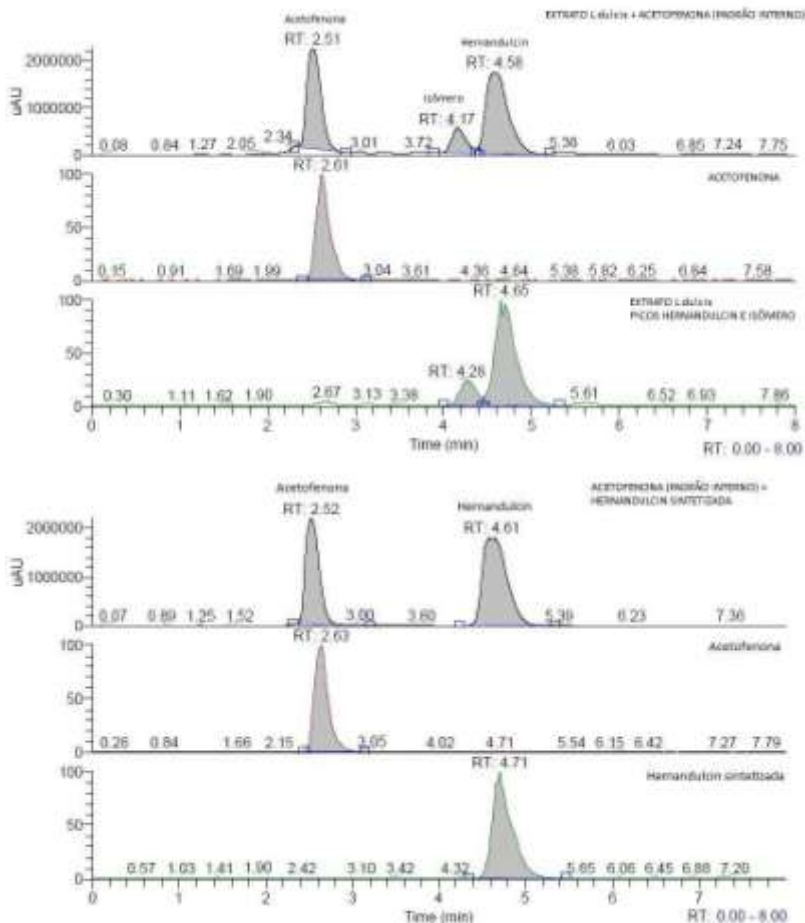


Figura 5.19: Comparação entre os cromatogramas do extrato de *L. dulcis* e do composto hernandulcin puro.

A confirmação dessa similaridade é possível ao observar a Figura 5.20, na qual são apresentados os espectros de massa dos compostos. Ainda, pode-se verificar a presença de um isômero de hernandulcin, pela análise do cromatograma da Figura 5.19 e semelhança do espectro de massas na Figura 5.20.

Conforme mencionado anteriormente no item 5.2 deste capítulo quando na análise do espectro do padrão de hernandulcin por essa metodologia, a fragmentação desse composto está de acordo com o

aquela proposta por Compadre *et al.* (1987). Como a sonda do equipamento opera em modo positivo, o pico do íon molecular $m/z = 237$ corresponde ao composto hernandulcin, de massa molar igual a 236 g/mol, acrescido de um hidrogênio (H^+).

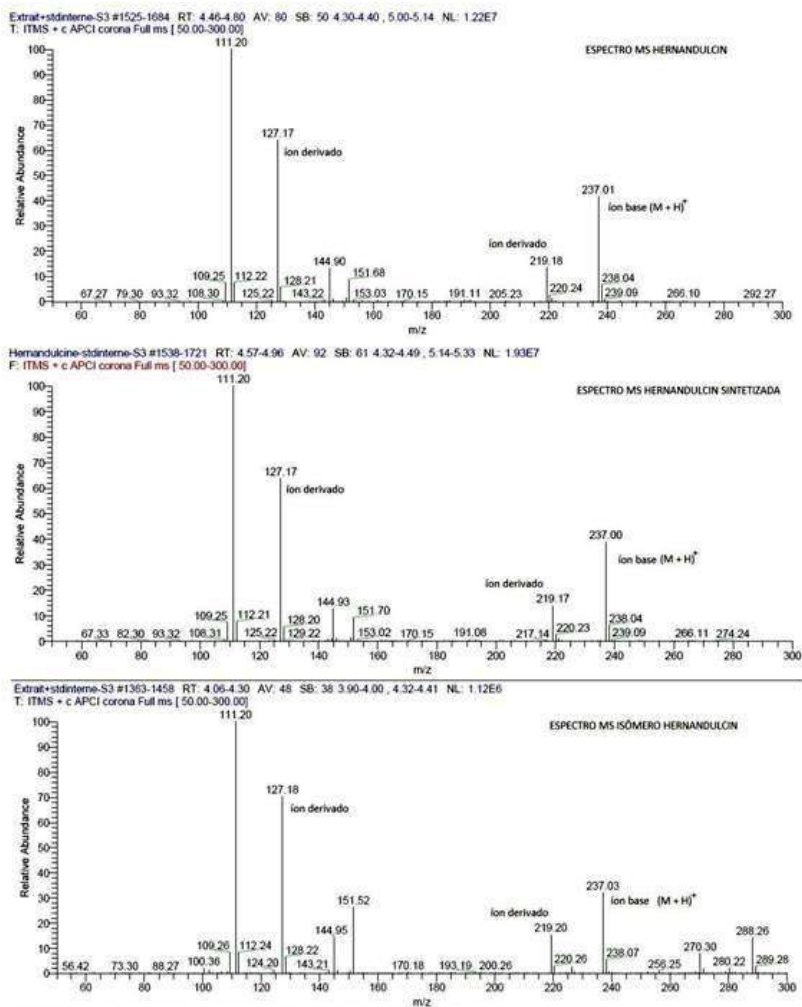


Figura 5.20: Comparação espectros de hernandulcin e seu isômero. Amostra do extrato e do composto sintetizado.

Após, foram realizadas análises dos extratos de *Lippia dulcis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o composto hernandulcin no produto obtido por extração com CO₂ supercrítico (120bar/35°C), tendo como referência a curva de calibração construída com o padrão sintético dessa substância. As análises foram realizadas em dois comprimentos de onda, 205 e 254nm. Porém, a melhor detecção ocorreu a 254nm. Por isso, esses resultados estão apresentados na Tabela 5.7 e também na Figura 5.21, a partir da qual foi possível calcular o percentual de hernandulcin nas amostras de extratos analisadas. Verificou-se que a quantidade média de hernandulcin presente nos extratos de *Lippia dulcis* situa-se entre 40,1 e 42,5% (massa de hernandulcin em relação à massa inicial de extrato utilizada na amostra). Esse percentual foi bastante próximo ao encontrado por Souto-Bachiller *et al.* (1997), os quais verificaram que o composto hernandulcin constituía 36% do óleo obtido por extração com diclorometano, e por Nayal (2009), que obteve entre 10,1 e 30,6% (m/v) de hernandulcin nos extratos etanólicos investigados. Compadre *et al.* (1987) verificaram a presença de 0,004% (m/m) de hernandulcin em relação à massa inicial de *Lippia dulcis* submetida ao processo de extração com éter de petróleo. Os valores encontrados para a quantidade de hernandulcin presente no extrato de *Lippia dulcis* nesse trabalho diferem de acordo com a técnica de análise utilizada, cromatografia a gás ou cromatografia líquida, sendo os valores da cromatografia a gás apenas uma estimativa em relação à área total dos cromatogramas encontrados, pois não foi realizada a quantificação do composto com base na injeção de padrões analíticos. Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência são, portanto, mais precisos, pois hernandulcin foi quantificado por meio da injeção do composto sintético como padrão externo.

Tabela 5.7: Resultados das análises dos extratos de *Lippia dulcis* por CLAE (254nm).

AMOSTRA	$[C]_{pi}$ (mg _{ACP} /μL _{ACN})	AREA _H	AREA _{pi}	R _{tH} (min)	R _{tpi} (min)	AREA _H / AREA _{pi}	$[C]_H$ (mg _H /μL _{ACN}) - calculada a partir da curva de calibração	Percentual de hernandulcin (%)	Média $[C]_H$ para as repetições	desvio padrão $[C]_H$ para as repetições (%)
Extrato A - Rep1	6,68E-05	38974852	34362008	7,703	3,825	1,13	2,47E-04	40,7%	2,44E-04	0,005
Extrato A - Rep2	6,68E-05	36459320	32648804	7,530	3,753	1,12	2,43E-04	40,1%	40,1%	
Extrato A - Rep3	6,68E-05	38387368	34062924	7,519	3,724	1,13	2,46E-04	40,5%		
Extrato A - Rep4	6,68E-05	39451412	35979200	7,517	3,730	1,10	2,38E-04	39,3%		
Extrato B - Rep1	6,68E-05	49167272	41291016	7,546	3,762	1,19	2,61E-04	42,9%	2,58E-04	0,011
Extrato B - Rep2	6,68E-05	49843708	41222432	7,527	3,740	1,21	2,65E-04	43,6%	42,5%	
Extrato B - Rep3	6,68E-05	50908868	44626592	7,538	3,760	1,14	2,49E-04	41,0%		

$[C]_{pi}$ (mg_{ACP}/μL_{ACN}): concentração do padrão interno acetofenona (mg acetofenona/μL acetonitrila);
AREA_H: área referente ao pico do composto hernandulcin no cromatograma;
AREA_{pi}: área referente ao pico do padrão interno (acetofenona) no cromatograma;
R_{tH} (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao composto hernandulcin na análise cromatográfica;
R_{tpi} (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao padrão interno (acetofenona) na análise cromatográfica;
 $[C]_H$ (mg_H/μL_{ACN}): concentração de hernandulcin na amostra analisada (mg hernandulcin/μL acetonitrila).

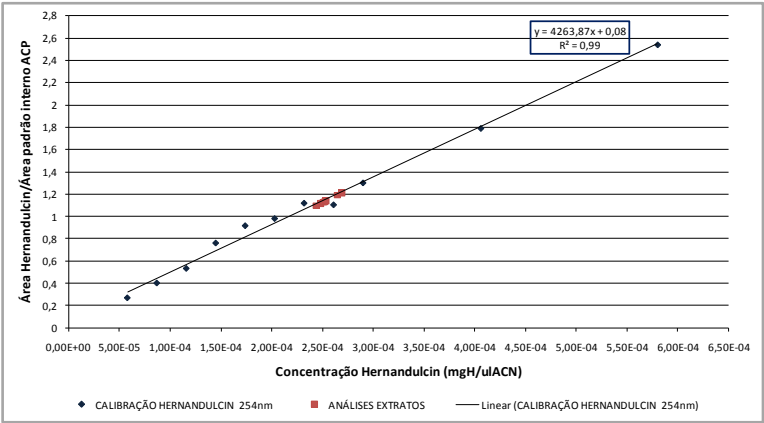


Figura 5.21: Análise dos extratos de *Lippia dulcis* por CLAE (254nm).

Nas Figuras 5.22 e 5.23 são apresentados os cromatogramas das amostras de extrato avaliadas (A e B), evidenciando os picos do padrão interno (acetofenona) e do composto hernandulcin.

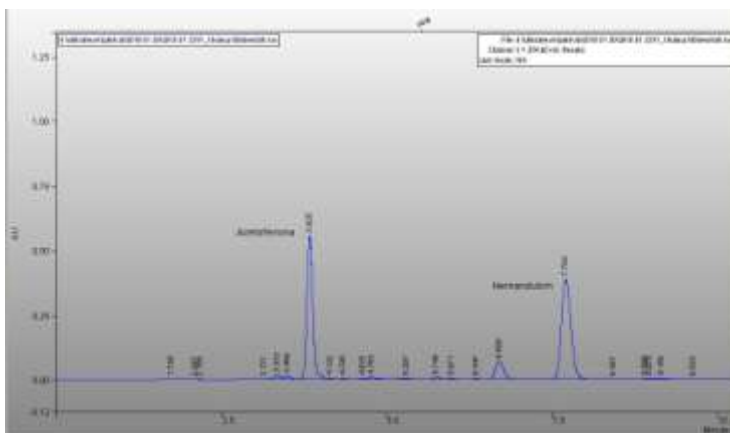


Figura 5.22: Cromatograma CLAE da amostra do Extrato A (Repetição 1) a 254nm.

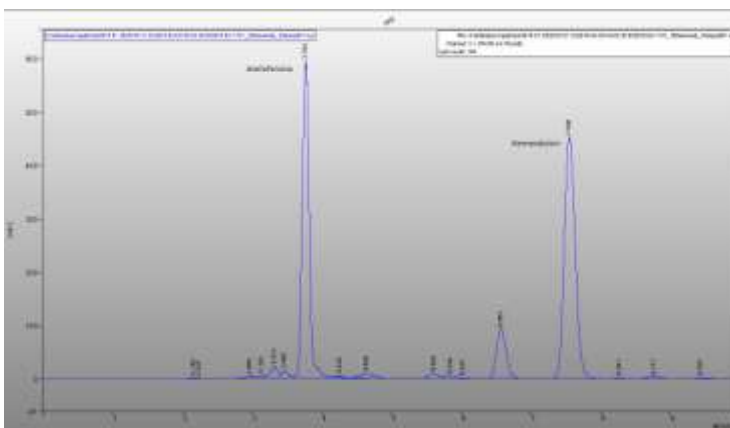


Figura 5.23: Cromatograma CLAE da amostra do Extrato B (Repetição 1) a 254nm.

5.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO

5.4.1 Adsorção e dessorção com CO₂ supercrítico

A aplicação da metodologia de fracionamento do extrato de *Lippia dulcis* teve como base os trabalhos realizados por Barth *et al.* (1994), Barth *et al.* (1995), CHOUCHI (1995) e Barth *et al.* (1996). Esses autores desenvolveram e aplicaram uma metodologia para o fracionamento de óleo essencial de limão (*Citrus limon*), bergamota, de cítricos e de *bigarade*.

Os experimentos foram conduzidos na unidade piloto descrita no item 4.5.1 do Capítulo 4 deste documento. Os parâmetros (pressão e temperatura) utilizados no processo foram os mesmos adotados por CHOUCHI (1995) para a separação de terpenos do óleo essencial de limão. Na coluna e no primeiro separador empregou-se o CO₂ na condição de fluido supercrítico para promover a separação dos compostos mais voláteis (P=80bar, T=40°C, $\rho_{\text{CO}_2}=0,28\text{g/cm}^3$). No segundo separador foi realizada a descompressão do CO₂ com a finalidade de precipitar os demais compostos. Ao trabalhar com pressões moderadas e temperaturas brandas, regula-se a massa específica do CO₂. Essas condições foram também empregadas para que não houvesse a precipitação de ceras nas frações coletadas. A utilização de sílica como adsorvente se deu em função da sua alta polaridade e a intenção de reter os compostos mais polares e mais voláteis e recuperar hernandulcin, de baixa polaridade, no primeiro ou no segundo separador. A sílica gel foi também o adsorvente utilizado nos experimentos conduzidos por Barth *et al.* (1994), CHOUCHI (1995) e Barth *et al.* (1996), os quais demonstraram que esse produto foi bastante seletivo para a separação de compostos terpênicos. Optou-se por utilizar n-hexano como co-solvente, pois os óleos essenciais são solúveis em solventes orgânicos e, também, devido à baixa polaridade do composto hernandulcin, que juntamente com o CO₂, também apolar, promoveria o arraste dessa substância. Ainda, a necessidade de um co-solvente no processo se deve a pouca quantidade disponível de extrato para a realização dos experimentos, facilitando a coleta das frações. A utilização de etanol para a recuperação da amostra do leito foi necessária para dessorver os compostos retidos na sílica, utilizando para isso um solvente polar.

Na Figura 5.24 são apresentados os cromatogramas obtidos por CG/MS para as frações recuperadas em cada ponto do processo (1.coluna, 2.separador 1 e 3.separador 2), para um dos experimentos realizados, neste caso o número 2, de acordo com a Tabela 4.5, item 4.5.1, do Capítulo 4 deste documento. No cromatograma 1 correspondente à amostra da coluna, observam-se dois picos majoritários. Esses compostos correspondem aos precursores de hernandulcin, os quais não são intensos nas amostras dos separadores 1 e 2, representados pelos cromatogramas 2 e 3. Nessas amostras verificou-se a presença dos demais compostos presentes no extrato de *Lippia dulcis*, sendo o pico do α -bisabolol o de maior intensidade.

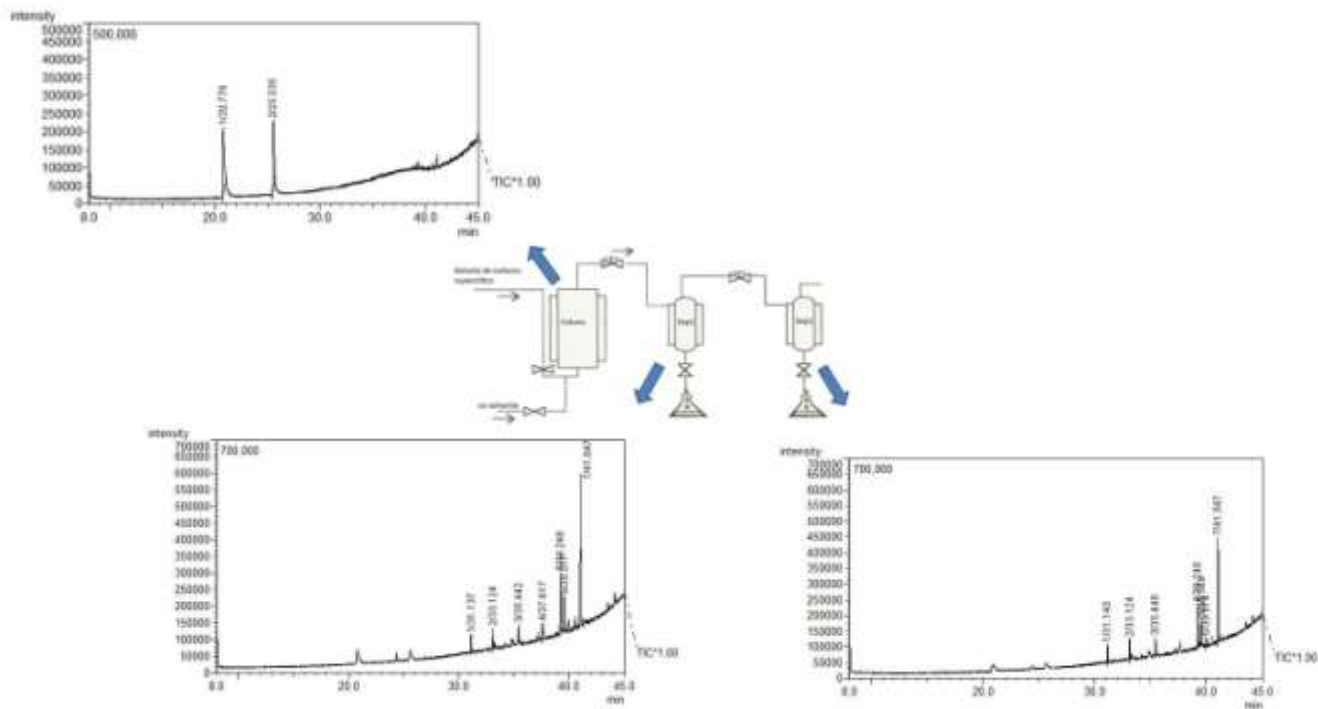


Figura 5.24: Resultados de cromatografia a gás (CG/MS) das frações obtidas no processo de adsorção e dessorção com CO_2 supercrítico (Experimento 2).

Embora se esperasse que o composto hernandulcin fosse recuperado nos separadores, considera-se o resultado positivo, pois de acordo com as análises de cromatografia a gás os compostos majoritários presentes nessa fração são os precursores de hernandulcin, ou seja, o adoçante está presente na amostra, pois nessa análise há a degradação térmica dessa substância. Uma hipótese para que o composto tenha sido retido no leito de adsorção é que embora se tenha utilizado solvente e co-solvente apolares para a dessorção de hernandulcin, a elevada polaridade da sílica, com muitos sítios ativos, reteve o composto e substâncias mais voláteis e com maior afinidade pelos solventes do que hernandulcin foram dessorvidas. Além disso, as condições supercríticas aplicadas no leito favoreceram o arraste de compostos mais voláteis presentes no extrato que foram, então, recuperados nos separadores.

A presença de hernandulcin nas amostras pode ser comprovada pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com as Tabelas 5.8 e 5.9, para 205 e 254nm, respectivamente. Os valores de concentração de hernandulcin nas amostras analisadas indicam uma maior concentração do composto retido no leito de adsorção para os experimentos realizados. Nessas tabelas constam apenas as amostras nas quais foi detectado o pico de hernandulcin.

Tabela 5.8: Análises por CLAE das frações coletadas nos experimentos (205nm).

AMOSTRA	$[C]_{pi}$ (mg _{ACP} /μL _{ACN})	AREA _H	AREA _{pi}	Rt _H (min)	Rt _{pi} (min)	AREA _H /AREA _{pi}	$[C]_H$ (mg _H em solução/μL _{ACN}) - calculada a partir da curva de calibração
Expto 1 - Leito	6,68E-05	153645664	86606144	6,707	3,599	1,77	8,20E-04
Expto 1 - Separador 1	6,68E-05	57447568	60475004	6,735	3,609	0,95	4,43E-04
Expto 1 - Separador 2	6,68E-05	61326268	67850872	6,711	3,599	0,90	4,22E-04
Expto 2 - Leito	6,68E-05	13584676	62063800	6,892	3,625	0,22	1,09E-04
Expto 2 - Separador 1	6,68E-05	1273170	60630160	6,855	3,620	0,02	1,81E-05
Expto 3 - Leito	6,68E-05	2971150	54308180	6,635	3,602	0,05	3,35E-05

$[C]_{pi}$ (mg_{ACP}/μL_{ACN}): concentração do padrão interno acetofenona (mg acetofenona/μL acetonitrila);

AREA_H: área referente ao pico do composto hernandulcin no cromatograma;

AREA_{pi}: área referente ao pico do padrão interno (acetofenona) no cromatograma;

Rt_H (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao composto hernandulcin na análise cromatográfica;

Rt_{pi} (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao padrão interno (acetofenona) na análise cromatográfica;

$[C]_H$ (mg_H/μL_{ACN}): concentração de hernandulcin na amostra analisada (mg hernandulcin/μL acetonitrila).

Tabela 5.9: Análises por CLAE das frações coletadas nos experimentos (254nm).

AMOSTRA	$[C]_{pi}$ (mg _{ACP} /μL _{ACN})	AREA _H	AREA _{pi}	Rt _H (min)	Rt _{pi} (min)	AREA _H / AREA _{pi}	$[C]_H$ (mg _H em solução/μL _{ACN}) - calculada a partir da curva de calibração
Expto 1 - Leito	6,68E-05	174770672	33509880	6,703	3,598	5,22	1,20E-03
Expto 1 - Separador 1	6,68E-05	52781932	27150232	6,735	3,607	1,94	4,37E-04
Expto 1 - Separador 2	6,68E-05	55758792	32675054	6,711	3,597	1,71	3,81E-04
Expto 2 - Leito	6,68E-05	14452557	26554432	6,891	3,623	0,54	1,09E-04
Expto 3 - Leito	6,68E-05	2919932	22523406	6,634	3,601	0,13	1,16E-05

$[C]_{pi}$ (mg_{ACP}/μL_{ACN}): concentração do padrão interno acetofenona (mg acetofenona/μL acetonitrila);

AREA_H: área referente ao pico do composto hernandulcin no cromatograma;

AREA_{pi}: área referente ao pico do padrão interno (acetofenona) no cromatograma;

Rt_H (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao composto hernandulcin na análise cromatográfica;

Rt_{pi} (min): *Retention time* (tempo de retenção) do pico referente ao padrão interno (acetofenona) na análise cromatográfica;

$[C]_H$ (mg_H/μL_{ACN}): concentração de hernandulcin na amostra analisada (mg hernandulcin/μL acetonitrila).

A seguir, nas Figuras 5.25 e 5.26, são apresentados os cromatogramas obtidos em CLAE para as amostras de um dos ensaios (experimento 2) e do extrato utilizado para esse experimento. É possível verificar que na amostra recuperada no leito de adsorção o pico de hernandulcin é mais intenso do que nas amostras dos separadores 1 e 2, indicando a maior concentração desse composto retido na coluna de sílica.

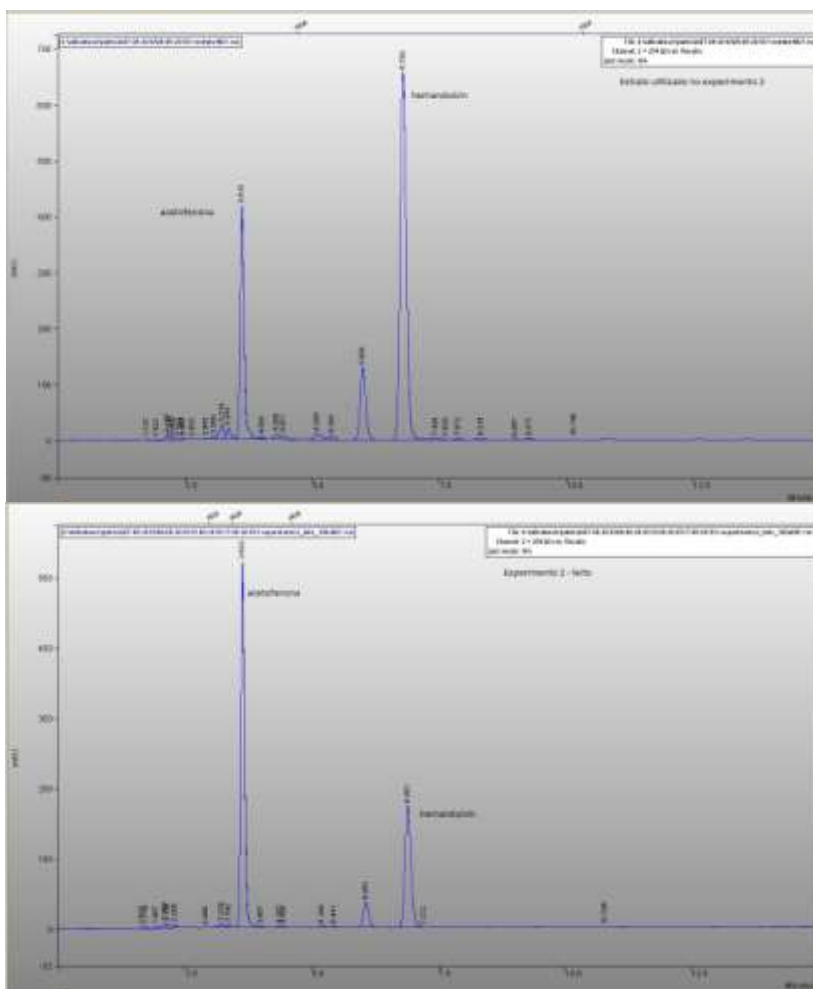


Figura 5.25: Cromatogramas CLAE (254nm) das amostras do Experimento 2 (extrato original, leito).

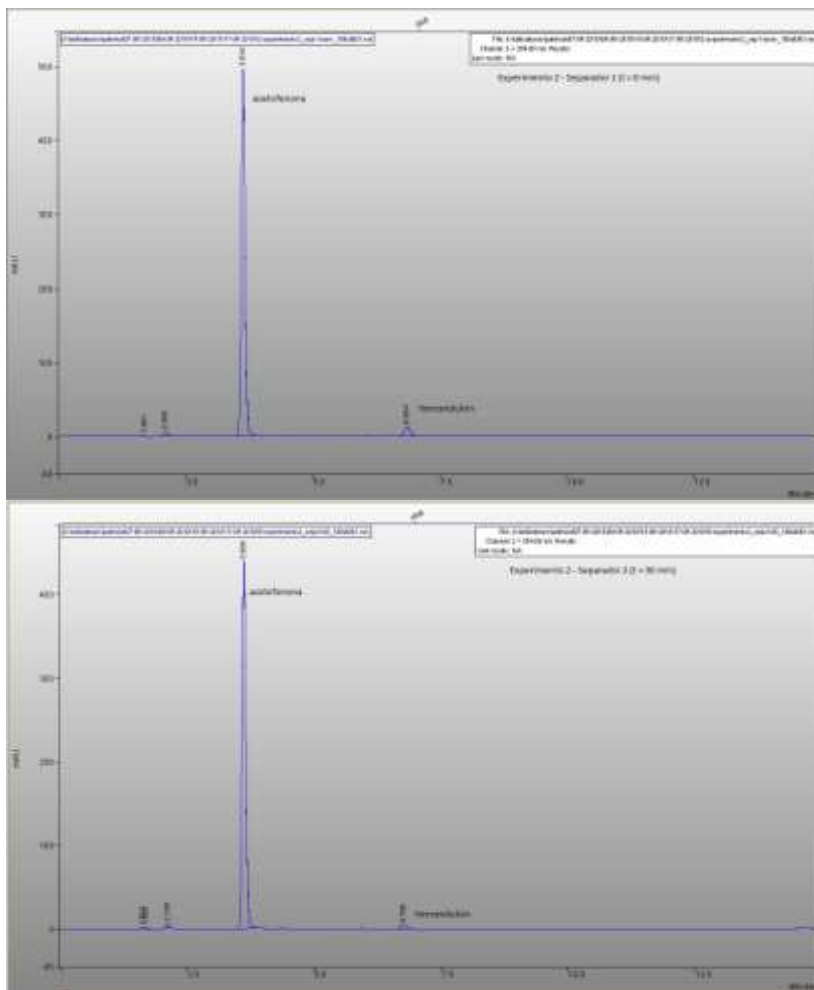


Figura 5.26: Cromatogramas CLAE (254nm) das amostras do Experimento 2 (separador 1, separador 2).

5.4.2 CLAE em escala semi-preparativa

O processo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa foi conduzido de maneira a coletar a fração correspondente ao pico do composto de hernandulcin. O extrato utilizado foi previamente analisado em escala analítica e foi verificado que o edulcorante corresponde a 42,3% m/m do extrato.

Nas Figuras 5.27 e 5.28 são apresentados os cromatogramas obtidos no processo: 1) Extrato de *Lippia dulcis* utilizado, avaliado em coluna analítica; 2) Processo em escala semi-preparativa; e 3) Fração correspondente ao pico de hernandulcin coletada em escala semi-preparativa e analisada em coluna analítica (Figura 5.28). As análises em escala analítica foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 4.7.4 do Capítulo 4 deste documento.

Pela análise dos cromatogramas é possível verificar que com essa metodologia conseguiu-se coletar a fração de extrato que contém o composto de interesse, hernandulcin, pela identificação do seu pico correspondente e recuperação da alíquota na linha de saída do equipamento. O pico correspondente ao tempo de retenção 8,528min no cromatograma 1 foi coletado em 8,186min na escala semi-preparativa (cromatograma 2) e corresponde à substância hernandulcin, conforme análise evidenciada no cromatograma 3. O procedimento foi realizado em duplicata.

A técnica de separação por CLAE semi-preparativo se mostrou um método bastante adequado para a separação de hernandulcin. Pode ser aplicada num processo de *scale-up* e, após, passar para uma escala preparativa e industrial. A adoção de CLAE como método de fracionamento em maior escala tem aplicações nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, por ser um processo que promove a separação com alto grau de pureza, necessidade crescente nesse ramo, embora os custos do processo sejam elevados (BRANDT e KUEPPERS, 2002).

No entanto, para produtos de alto valor agregado o pode ser justificada a sua aplicação.

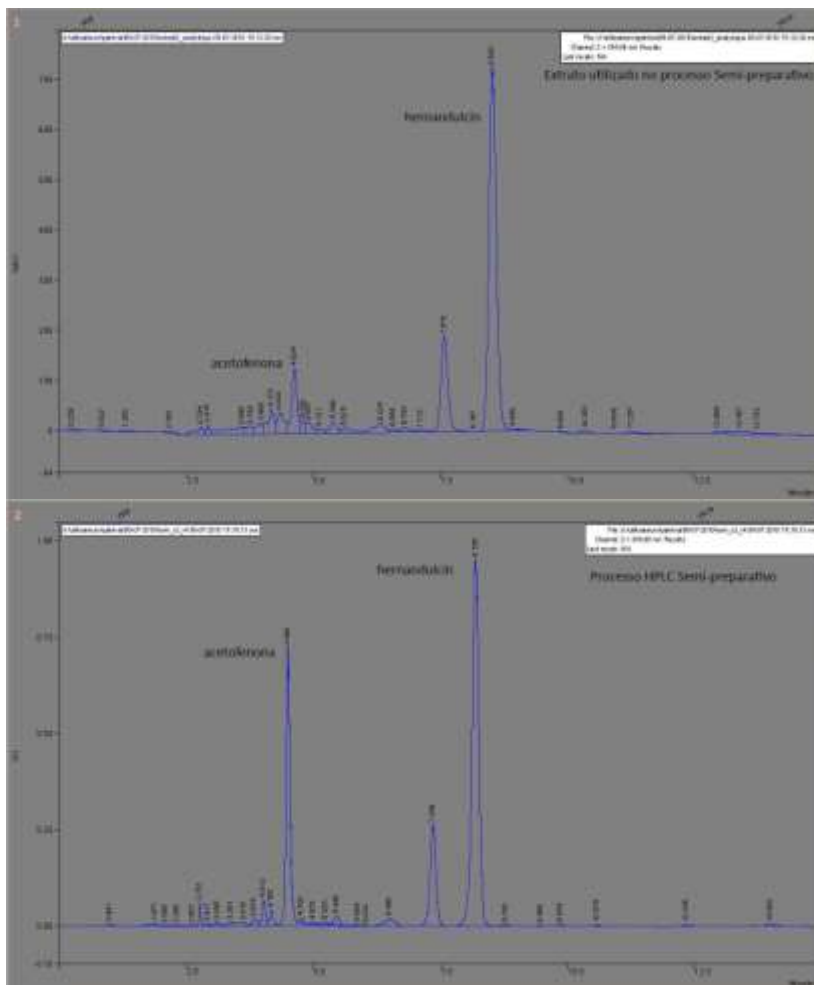


Figura 5.27: Cromatogramas CLAE à 254nm (1-Extrato, escala analítica; 2-Processo semi-preparativo;

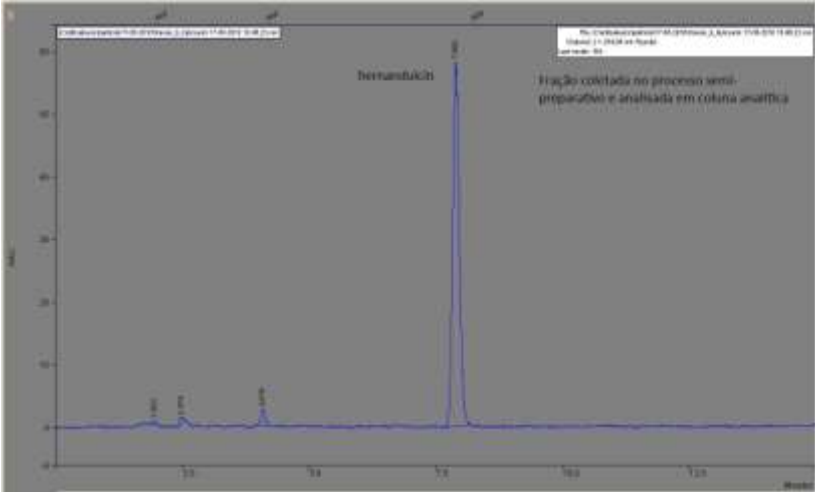


Figura 5.28: Cromatograma CLAE à 254nm (3-Fração hernandulcin, escala analítica).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho permitem concluir que:

- a) Ao utilizar o processo de extração em meio supercrítico é possível obter uma maior recuperação de produto do que com a hidrodestilação. Isso porque ao utilizar a hidrodestilação obtém-se a fração volátil do extrato, ou seja, o óleo essencial, diferentemente do que ocorre na extração com CO₂ denso, no qual o extrato é o produto resultante, o qual contém além do óleo, compostos de maior massa molecular. E, por isso, a quantidade recuperada é mais elevada;
- b) Os resultados de composição do óleo e extratos obtidos estão de acordo com o que é citado na literatura para essa matriz vegetal;
- c) Foi possível identificar e quantificar o composto de interesse, hernandulcin, nos extratos obtidos em meio supercrítico e por hidrodestilação, por meio de técnicas cromatográficas;
- d) A quantidade de hernandulcin encontrada nas amostras de verão é superior àquela obtida nas amostras de inverno para o extrato oriundo do processo de extração em meio supercrítico. No entanto, em função das diferentes técnicas analíticas empregadas na análise desses extratos, não é possível associar a diferença de concentração à época de colheita da matriz vegetal. Isso porque as amostras de inverno foram analisadas por cromatografia a gás e, nesse caso, obteve-se apenas uma estimativa em relação à área total do cromatograma. Enquanto que as amostras de verão foram analisadas por cromatografia líquida, sendo a quantificação do composto possível por meio da utilização de um padrão analítico, o que acarreta em maior precisão

dos resultados. Os valores encontrados para a concentração de hernandulcin foram 19,215% (área relativa) para inverno e, em média, 40,1 à 42,5% (massa de hernandulcin em relação à massa inicial de extrato utilizada na amostra) no verão.

- e) Em comparação com a literatura, na fração de sesquiterpenos do extrato, os compostos copaeno, cariofileno, δ -cadineno e α -bisabolol foram obtidos em concentração maior do que aquelas relatadas por Souto-Bachiller *et al.* (1997) e similares ao trabalho realizado por Melo (2007);
- f) Foi possível realizar a síntese de hernandulcin, purificá-lo e caracterizá-lo, de acordo com referência da literatura. Essa etapa teve fundamental importância para o desenvolvimento do trabalho, o que permitiu a obtenção de um padrão analítico e, com isso, a identificação dessa substância nos extratos naturais de *Lippia dulcis*;
- g) A aplicação da metodologia de separação da fração de hernandulcin foi, em parte, alcançada, ao permitir o isolamento do composto. No entanto, carece ainda de uma avaliação específica para essa substância, de modo a avaliar a recuperação final no processo, a interação com o solvente supercrítico e com o leito de adsorção. Pode-se dizer que se obteve um resultado satisfatório dentro do que foi proposto;
- h) Com o método de fracionamento utilizando CLAE em escala semi-preparativa foi possível recuperar a fração de hernandulcin.

Ao longo do desenvolvimento dessa tese verificou-se que as possibilidades de estudo do tema proposto são muitas. Partiu-se desde o cultivo da matriz vegetal até o fracionamento para a obtenção de uma fração rica em hernandulcin. Em cada uma das etapas necessárias ao trabalho existem pontos a serem explorados minuciosamente. Apesar desse trabalho não contemplar todos esses itens, espera-se que possa servir como base para a continuidade da pesquisa de extração do óleo de *Lippia dulcis* em meio supercrítico, com posterior fracionamento e aplicação do produto final (extrato ou fração). Pois, mesmo essa planta

não sendo nativa do Brasil, acredita-se que pela sua fácil adaptação tenha potencial de exploração para a obtenção de um produto de alto valor agregado ao ser processada com tecnologia supercrítica.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Avaliar a variação de outros parâmetros do processo de extração com CO₂ supercrítico para *Lippia dulcis* Trev., tais como vazão de solvente e tempo de extração;
- b) Avaliar a solubilidade do composto hernandulcin no CO₂ supercrítico, de maneira a ajustar o processo para que seja seletivo para a extração dessa substância;
- c) Utilizar mais de um separador no processo de extração, em condições que permitam a separação das ceras cuticulares do extrato;
- d) Avaliar o processo de fracionamento variando pressão e temperatura na coluna de adsorção e nos separadores, bem como a vazão de solvente para o processo de dessorção. Além disso, avaliar a interação e o tempo de contato entre o sistema leito de adsorção/CO₂/co-solvente/extrato, de maneira a tornar o processo mais seletivo. Avaliar também outros co-solventes e adsorventes para o processo;
- e) Avaliar a aplicação comercial/industrial do produto, potenciais mercados e viabilidade do processo (custo de fabricação x qualidade do produto).
- f) Modelar matematicamente o processo para que possa ser otimizado.
- g) Validar uma metodologia analítica para a identificação e quantificação do composto hernandulcin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K.M. International Thermodynamic Tables of the Fluid State. Carbon Dioxide, v.3, **Pergamon Press**, 1976.

BARBOSA, F.F.; BARBOSA, L.A.; MELO, E.C.; BOTELHO, F.M.; SANTOS, R.H.S. Influência da temperatura na temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1221-1225, 2006.

BARTH, D.; CHOUCI, D.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E.; PERRUT, M. Desorption of lemon peel oil by supercritical carbon dioxide: Deterpenation and psoralens elimination. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.7, n.3, p.177-183, 1994.

BARTH, D.; CHOUCI, D.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Supercritical CO₂ desorption of Bergamot peel oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.34, p.4508-4513, 1995.

BARTH, D. e CHOUCI, D. Bigarade peel oil fractionation by supercritical carbon dioxide desorption. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.44, p.1100-1104, 1996.

BERNARDO-GIL, M.G.; RIBEIRO, M.A.; ESQUÍVEL, M.M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim de Biotecnologia**, 73, 24-30, 2002.

BRANDT, A. e KUEPPERS, S. Practical aspects of preparative HPLC in pharmaceutical and development production. **LC-GC Europe**, 2002.

BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Ed. Steinkopff Darmstadt Springer, New York, 1994.

CARLSON, L.H.C.; MACHADO, R.A.F.; SPRICIGO, C.B.; PEREIRA, L.K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.21, n1, p.33-39, 2001.

CHOUCHI, D. **Extrographie: Couplage in situ entre extraction et chromatographie supercritique. Application a la deterpenation et la detoxification des huiles essentielles d'agrumes.** Thèse de Doctorat (Institut National Polytechnique de Lorraine), 264 p., France, 1995.

COMPADRE, C.M.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; KAMATH, S.K. Hernandulcin: An Intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature. **Science**, v.227, n.4685, p.417-419, 1985.

COMPADRE, C.M.; HUSSAIN, R.A.; COMPADRE, R.L.L.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. The Intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcin: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, n.2, p.273-279, 1987.

DONELIAN, A.; CARLSON, L.H.C.; LOPES, T.J.; MACHADO, R.A.F. Comparison of extraction of Patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.48, p.15-20, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Meio Ambiente. As plantas praguicidas. **Informativo Meio Ambiente e Agricultura**, ano XII, n.47, jul/ago 2004.

GALHIANE, M.S.; RISSATO, S.R.; CHIERICE, G.O.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v.70, n.2, p.286-292, 2006.

GARCÍA-RISCO, M.R.; VICENTE, G.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. **The Journal of Supercritical Fluids**, Accepted manuscript, 2010.

GASPAR, F.; SANTOS, S.; KING, M.B. Extraction of essential oils and cuticular waxes with compressed CO₂: Effect of matrix pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.39, n.12, p.4603–4608, 2000.

GHASEMI, E.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N.; SEFIDKON, F. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia sieberi*. **Journal of Food Engineering**, v.79, n.1, p.306-311, 2007.

GOMES, P.B.; MATA, V.G.; RODRIGUES, A.E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.41, p.50-60, 2007.

JUSFORGUES, P.; SHAIMI, M. Preparative supercritical fluid chromatography. **Analusius Magazine**, v.26, n.7, 1998.

KAMATOU, G.P.P.; VAN ZYL, R.L.; VAN VUUREN, S.F.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; VILJOEN, A.M. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. **South African Journal of Botany**, v.74, n.2, p.230-237, 2008.

KANEDA, N.; LEE, I.S.; GUPTA, M.P.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, A.D. (+)-4 β -hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, v.55, n.8, p.1136-1141, 1992.

KIM, J.H.; LIM, H.J.; CHEON, S.H. Synthesis of (+)-hernandulcin and (+)-*epi*hernandulcin. **Tetrahedron letters**, v.43, p.4721-4722, 2002.

KING, M.B.; BOTT, T.R., **Extraction of natural products using near-critical solvents**. Chapman e Hall, Bishopbriggs, Glasgow, 1993.

KINGHORN, A.D.; COMPADRE, C.M., PEZZUTO, J.M. Low cariogenic sweetening agents. U.S. Patent No. 4,808,409. 16 agosto 1984, 28 fevereiro 1989.

KINGHORN, A.D. e SOEJARTO, D.D. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.7, p.1169-1179, 2002.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; GARCÍA, M.C.C.; GRIMA, E.M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v.123, p.928-935, 2010.

MCHUGH, M.; KRUKONIS, V.J. Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice. 2nd Ed., Butterworth – Heinemann, USA, 1994.

MELO, C.N.C. **Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, espécies de la familia Verbenaceae**. Tesis de grado en Química. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, 153 p., 2007.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v.967, n.1, p.115-130, 2002.

MORI, K.; KATO, M. Synthesis of (6S, 1'S)-(+)-hernandulcin, a sweetener and its isomers. **Tetrahedron**, v.42, n.21, p.5895-5900, 1986.

NAYAL, A.R. **Phytochemische und pharmazeutisch-biologische Untersuchungen an der aztekischen Süßpflanze *Lippia dulcis* Trev.** Doctoral thesis (Department of Biology, Chemistry and Pharmacy). 156 p. Universität Berlin, 2009.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.3, p.201-214, 2001.

PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M.A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*: Review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, n.1, p.1-4, 2005.

PERRUT, M. Supercritical fluid application in materials science: Editorial Review. **Current Opinion in Solid State & Materials Sciences**, v.7, p.319, 2003.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis: Review. **Journal of Chromatography A**, v.1163, n.1-2, p.2-24, 2007.

RAMOS, F. Extração de óleos essenciais. Etno-Botânica. Disponível em: <<http://pensologosou.no.sapo.pt/etnobotanica/oleosessenciais.htm>>. Acesso em: 14/11/2007.

REVERCHON, E.; AMBRUOSI, A.; SENATORE, F. Isolation of peppermint oil using supercritical CO₂ extraction. **Journal of Flavour Fragrance**, v.9, n.19, 1994.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, n.1, p.1-37, 1997.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter: Review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.38, n.2, p.146-166, 2006.

ROY, B.C.; GOTO, M.; KODAMA, A.; HIROSE, T. Supercritical CO₂ extraction of essential oils and cuticular waxes from peppermint leaves.

Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.67, n.1, p.21-26, 1996.

ROSA, P.T.V. e MEIRELES, M.A.A. Supercritical technology in Brazil: systems investigated (1994-2003). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p.109-117, 2005.

SANDERS, N., Food legislation and the scope for increased use of near-critical fluid extraction operations in the food, flavouring and pharmaceutical industries. In: KING, M. B.; BOTT, T. R., **Extraction of natural products using near-critical solvents**. London: Chapman e Hall, 325p. Cap. 2, p. 35-49, 1993.

SARMENTO, L.A.V.; SPRÍCIGO, C.B.; PETRUS, J.C.C.; CARLSON, L.H.C.; MACHADO, R.A.F. Performance of reverse osmosis membranes in the separation of supercritical CO₂ and essential oils. **Journal of Membrane Science**, v.237, p.71-76, 2004.

SILVA, F.; SANTOS, R.H.S.; DINIZ, E.R.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V.W.D.; LIMA, R.R. Teor e composição do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.6, n.1, p.33-38, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, 3^a.ed. Ed. Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2001.

SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, v.16, p.101-107, 2002.

SOUTO-BACHILLER, F.A.; DE JESUS-ECHEVARRIA, M.; CÁRDENAS-GONZÁLEZ, O.E.; ACUÑA-RODRIGUEZ, M.F.; MELÉNDEZ, P.A.; ROMERO-RAMSEY, L. Terpenoid Composition of *Lippia Dulcis*. **Phytochemistry**, v.44, n.6, p.1077-1086, 1997.

SPRICIGO, C.B.; BOLZAN, A.; MACHADO, R.A.F.; CARLSON, L.H.C.; PETRUS, J.C.C. Separation of nutmeg essential oil and dense CO₂ with a cellulose acetate reverse osmosis membrane. **Journal of Membrane Science**, v.188, p.173, 2001.

VERSCHUERE, M.; SANDRA, P.; DAVID, F. Fractionation by SFE and microcolumn analysis of the essential oil and the bitter principles of hops. **Journal of Chromatographic Science**, v.30, n.10, 388, 1992.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). 78p. Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2006.

YAMAUCHI, Y.; SAITO, M. Fractionation of lemon peel oil by semipreparative supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.505, n.1, 237-246, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de calibração de hernandulcin para CLAE

A construção de uma curva de calibração para o composto hernandulcin se fez necessária de maneira que fosse possível analisar e quantificar as amostras de extratos obtidas nos processos de extração e fracionamento. Para isso, preparou-se o padrão do composto sintetizado em diferentes concentrações e a curva foi construída utilizando a metodologia de análise descrita no item 4.7.4 do Capítulo 4 deste documento.

Foram preparadas soluções de hernandulcin com concentrações entre $5,8 \times 10^{-5}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN} (C₁) e $5,8 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN} (C₁₁). As soluções foram preparadas em acetonitrila (ACN), acrescentando o padrão interno acetofenona (ACP) na concentração de $6,68 \times 10^{-5}$ mg_{ACP}/μL_{ACN}. As análises foram realizadas a 205 e 254nm. A Tabela A.1 apresenta as soluções analisadas, bem como as respostas obtidas nos cromatogramas (áreas dos picos de hernandulcin e do padrão interno) para 205nm. Na Figura A.1 é apresentada a curva de calibração correspondente a 205nm, bem como a sua correlação.

Tabela A.1: Dados obtidos por CLAE para os padrões de hernandulcin (205nm).

Solução	[C] _H (mg _H /μL _{ACN})	[C] _{PI} (mg _{ACP} /μL _{ACN})	Área _H ^a	Área _{PI} ^b	Rt _H ^c (min)	Rt _{PI} ^d (min)	Área _H /Área _{PI}
C ₁	$5,80 \times 10^{-5}$	$6,68 \times 10^{-5}$	10554573	99969920	7,559	3,744	0,1056
C ₂	$8,70 \times 10^{-5}$	$6,68 \times 10^{-5}$	19849264	111683872	7,581	3,760	0,1777
C ₃	$1,16 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	22804528	103557992	7,597	3,776	0,2202
C ₄	$1,45 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	33985204	106462232	7,583	3,759	0,3192
C ₅	$1,74 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	42651292	109689752	7,596	3,771	0,3888
C ₆	$2,03 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	48771212	112946912	7,562	3,760	0,4318
C ₇	$2,32 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	50691488	106794448	7,519	3,744	0,4747
C ₈	$2,61 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	52086752	99678808	7,547	3,755	0,5225
C ₉	$2,90 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	63686508	100507456	7,539	3,748	0,6336
C ₁₀	$4,06 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	69491504	84318624	7,544	3,724	0,8242
C ₁₁	$5,80 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-5}$	125176929	97952952	7,543	3,760	1,2779

^aÁrea_H: área do pico de hernandulcin

^bÁrea_{ACP}: área do pico de acetofenona

^cRt_H: tempo de retenção do pico de hernandulcin

^dRt_H: tempo de retenção do pico de acetofenona

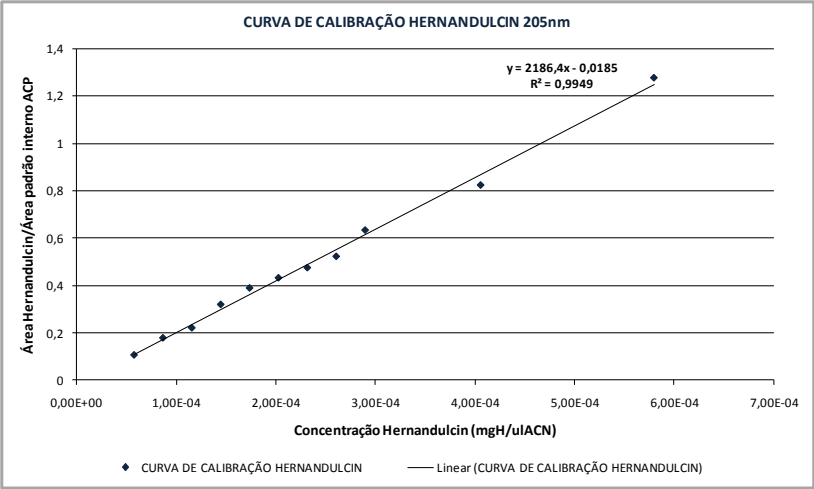


Figura A.1: Curva de calibração de hernandulcin (205nm).

Já na Tabela A.2 são apresentados os dados obtidos nas análises das soluções de hernandulcin a 254nm. A Figura A.2 corresponde à curva de calibração para este comprimento de onda e a sua correlação.

Tabela A.2: Dados obtidos por CLAE para os padrões de hernandulcin (254nm).

Solução	[C] _H (mgH/μL _{ACN})	[C] _{pi} (mg _{ACP} /μL _{ACN})	Área _H ^a	Área _{pi} ^b	Rt _H ^c (min)	Rt _{pi} ^d (min)	Área _H /Área _{pi}
C ₁	5,80x10 ⁻⁵	6,68x10 ⁻⁵	11493994	42929580	7,559	3,742	0,2677
C ₂	8,70x10 ⁻⁵	6,68x10 ⁻⁵	21375008	53327152	7,579	3,758	0,4008
C ₃	1,16x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	24562666	46149444	7,594	3,774	0,5322
C ₄	1,45x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	36920960	48552140	7,581	3,757	0,7604
C ₅	1,74x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	46258616	50484636	7,593	3,770	0,9163
C ₆	2,03x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	52623296	53658488	7,560	3,760	0,9807
C ₇	2,32x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	54737384	48935080	7,517	3,743	1,1186
C ₈	2,61x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	56766964	51420716	7,545	3,753	1,1040
C ₉	2,90x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	69227984	53203596	7,537	3,749	1,3012
C ₁₀	4,06x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	84558240	47215476	7,542	3,723	1,7909
C ₁₁	5,80x10 ⁻⁴	6,68x10 ⁻⁵	136068796	53516932	7,541	3,758	2,5425

^aÁrea_H: área do pico de hernandulcin
^bÁrea_{ACP}: área do pico de acetofenona
^cRt_H: tempo de retenção do pico de hernandulcin
^dRt_H: tempo de retenção do pico de acetofenona

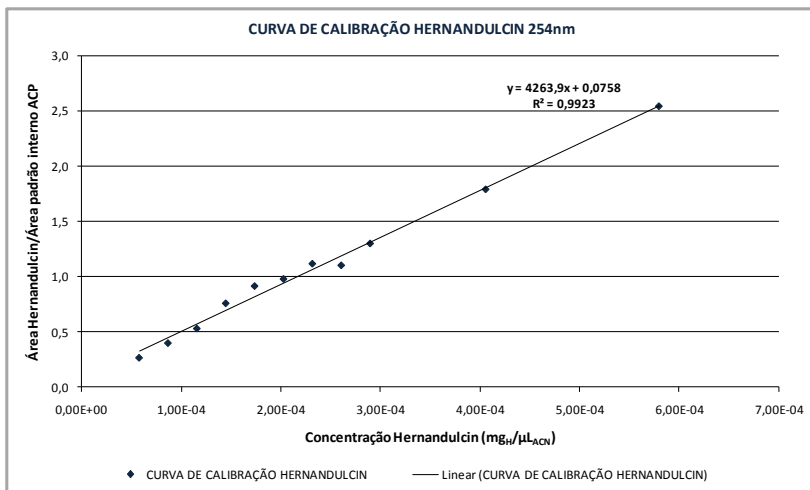


Figura A.2: Curva de calibração de hernandulcin (254nm).

Os cromatogramas obtidos por CLAE para cada solução de hernandulcin são mostrados nas Figuras A.3 à A.26, a seguir, para os comprimentos de onda de 205 e 254nm. A numeração dos cromatogramas segue a ordem de concentração de hernandulcin na solução, conforme apresentado nas Tabelas A.1 e A.2. Cada solução possui um padrão interno (acetofenona), na concentração de $6,68 \times 10^{-5}$ mg_{ACP}/μL_{ACN}. As Figuras A.3 e A.4 referem-se à solução sem a adição do produto hernandulcin, ou seja, a solução do branco.

- 1) $C_1 = 5,80 \times 10^{-5}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 2) $C_2 = 8,70 \times 10^{-5}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 3) $C_3 = 1,16 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 4) $C_4 = 1,45 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 5) $C_5 = 1,74 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 6) $C_6 = 2,03 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 7) $C_7 = 2,32 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 8) $C_8 = 2,61 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 9) $C_9 = 2,90 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 10) $C_{10} = 4,06 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}
- 11) $C_{11} = 5,80 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}

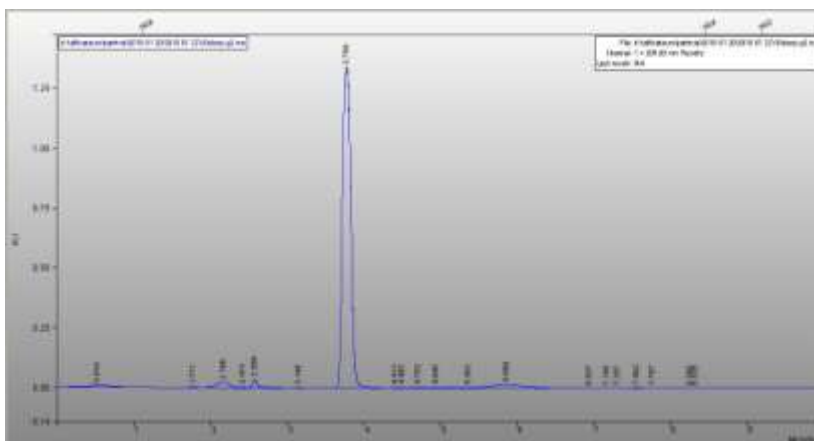


Figura A.3: Cromatograma CLAE 205nm para $C_0 = 0,00 \text{ mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

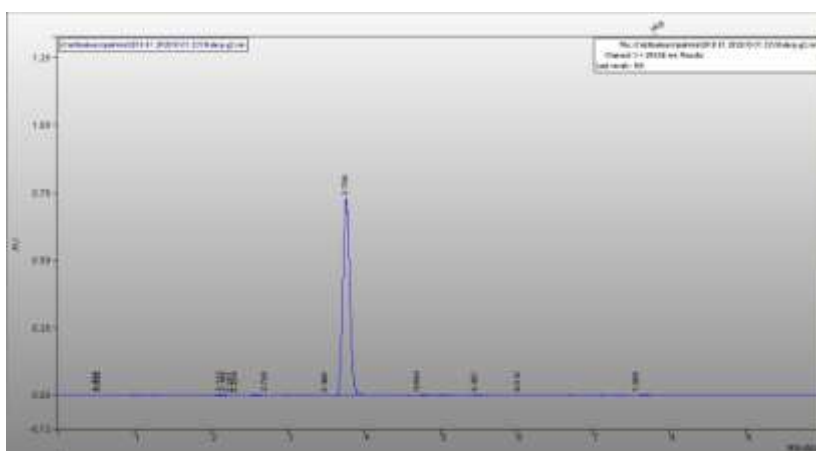


Figura A.4: Cromatograma CLAE 254nm para $C_0 = 0,00 \text{ mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

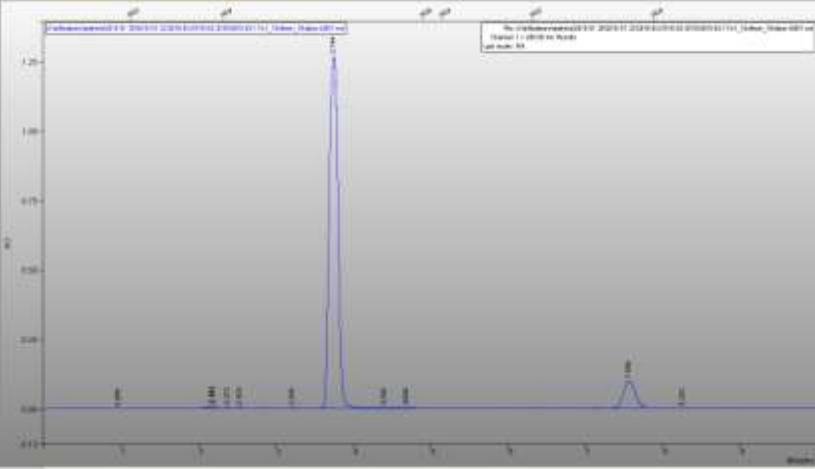


Figura A.5: Cromatograma CLAE 205nm para 1) $C_1 = 5,80 \times 10^{-5}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

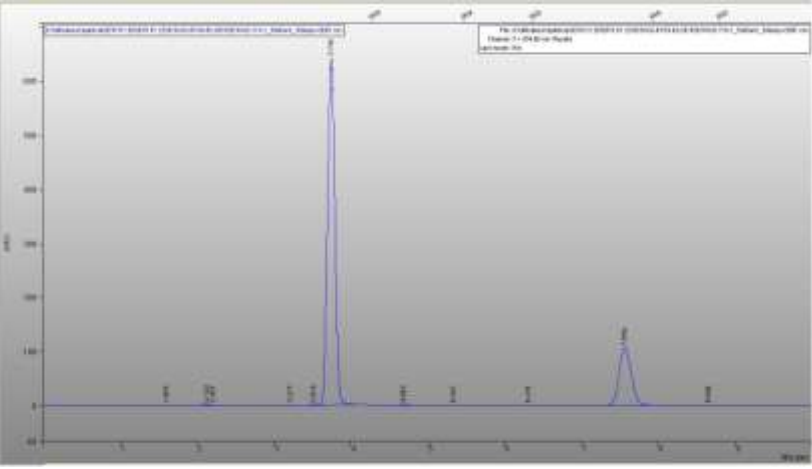


Figura A.6: Cromatograma CLAE 254nm para 1) $C_1 = 5,80 \times 10^{-5}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

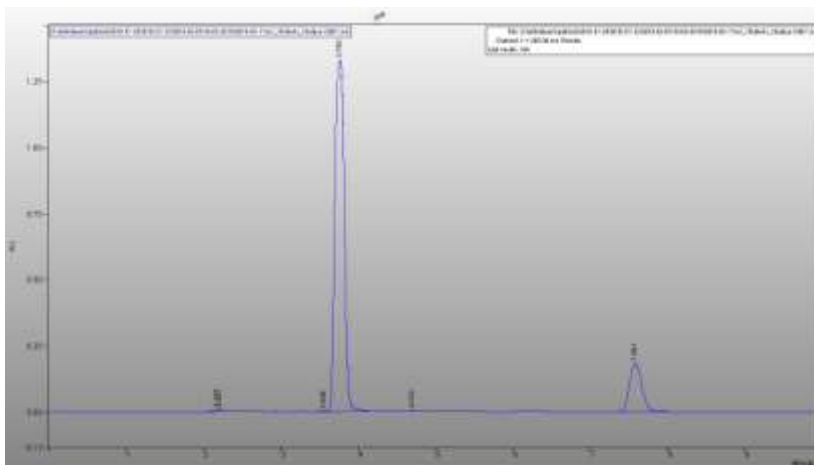


Figura A.7: Cromatograma CLAE 205nm para 2) $C_2 = 8,70 \times 10^{-5}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

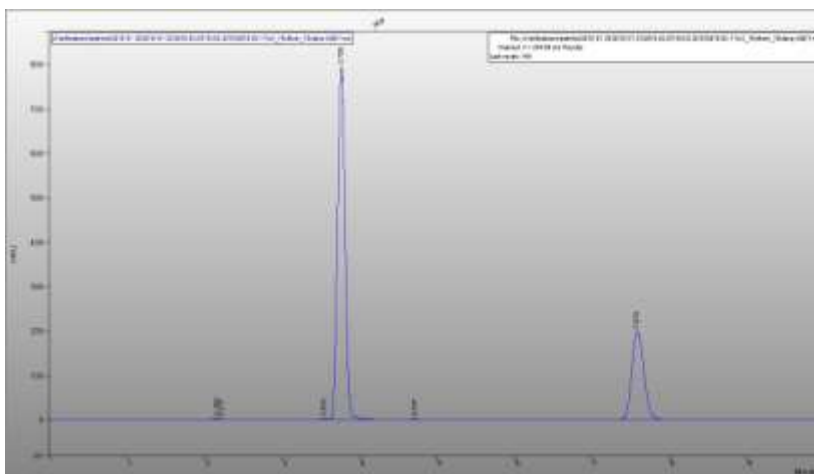


Figura A.8: Cromatograma CLAE 254nm para 2) $C_2 = 8,70 \times 10^{-5}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

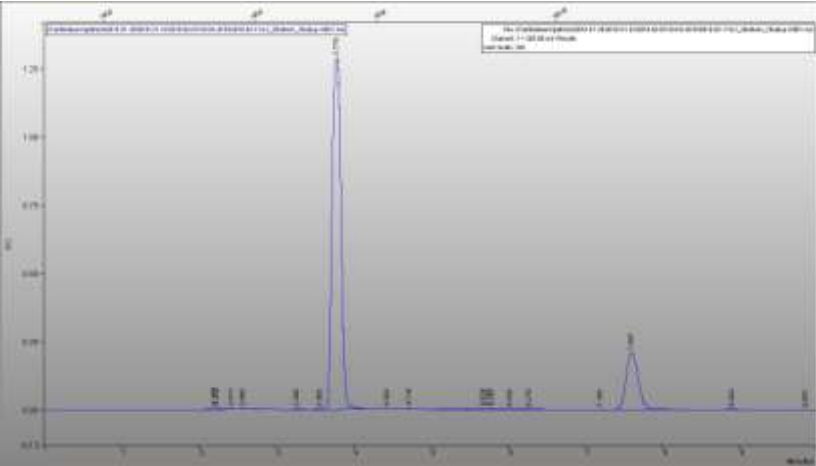


Figura A.9: Cromatograma CLAE 205nm para 3) $C_3 = 1,16 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

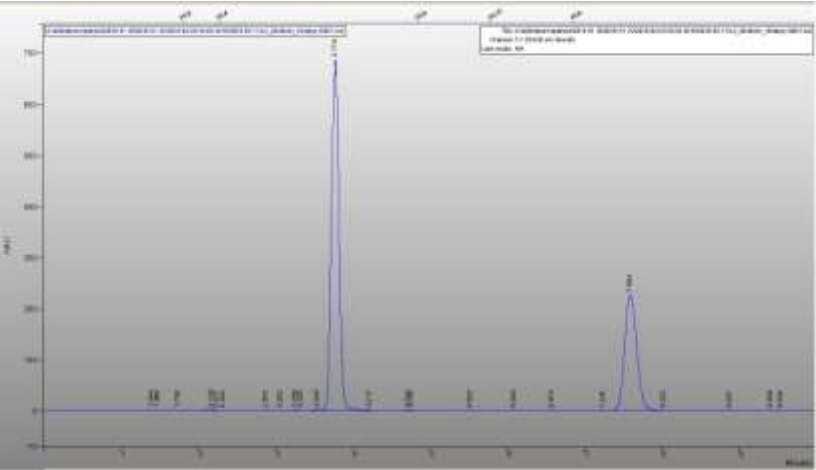


Figura A.10: Cromatograma CLAE 254nm para 3) $C_3 = 1,16 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

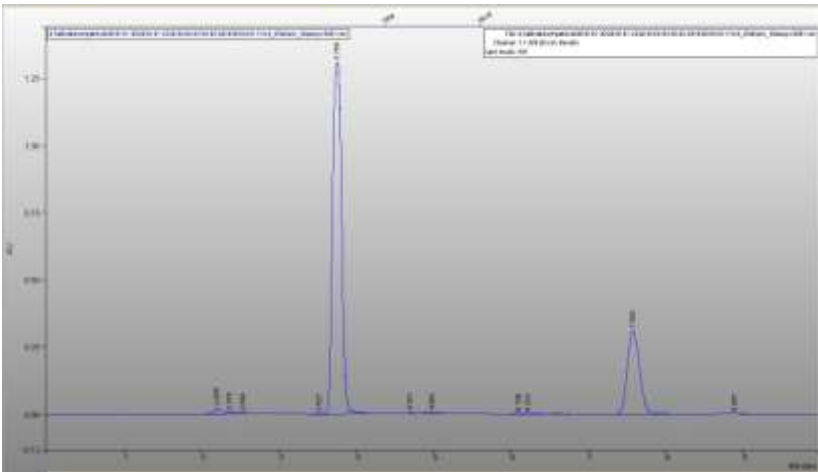


Figura A.11: Cromatograma CLAE 205nm para 4) $C_4 = 1,45 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

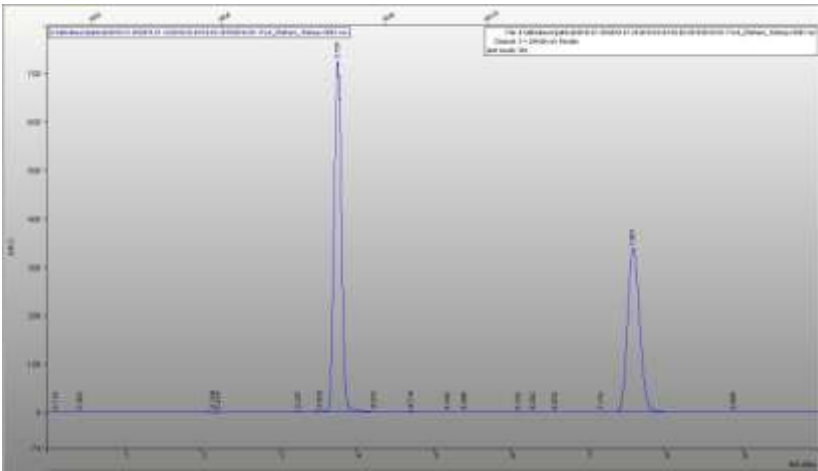


Figura A.12: Cromatograma CLAE 254nm para 4) $C_4 = 1,45 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

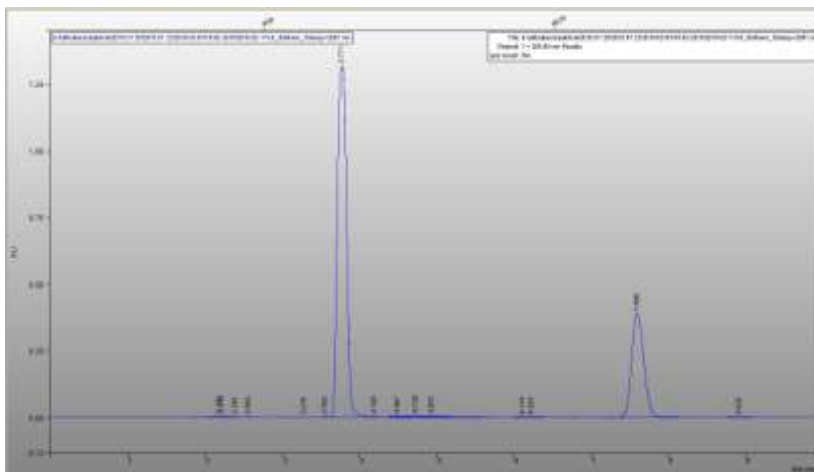


Figura A.13: Cromatograma CLAE 205nm para 5) $C_5 = 1,74 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

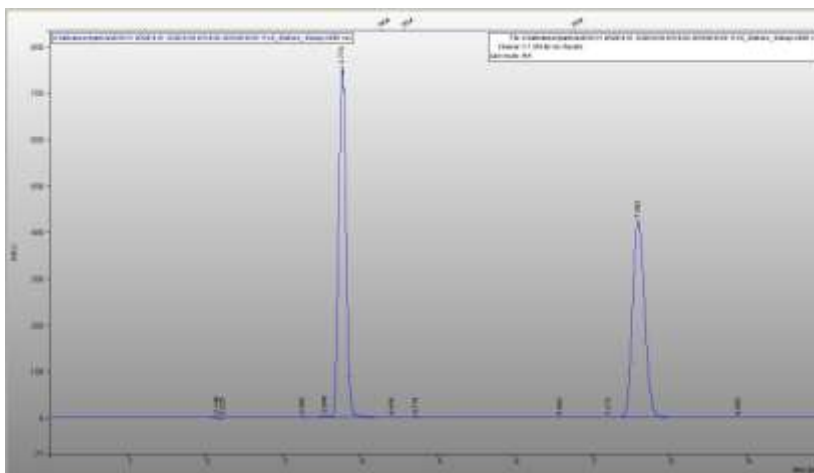


Figura A.14: Cromatograma CLAE 254nm para 5) $C_5 = 1,74 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

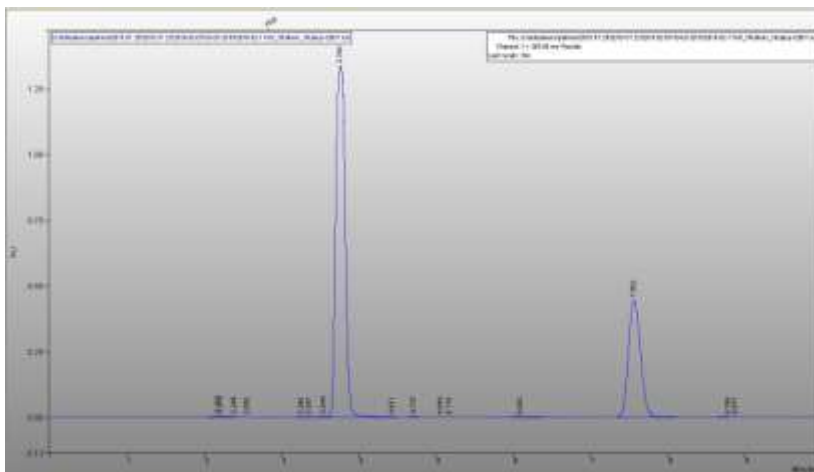


Figura A.15: Cromatograma CLAE 205nm para 6) $C_6 = 2,03 \times 10^{-4}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

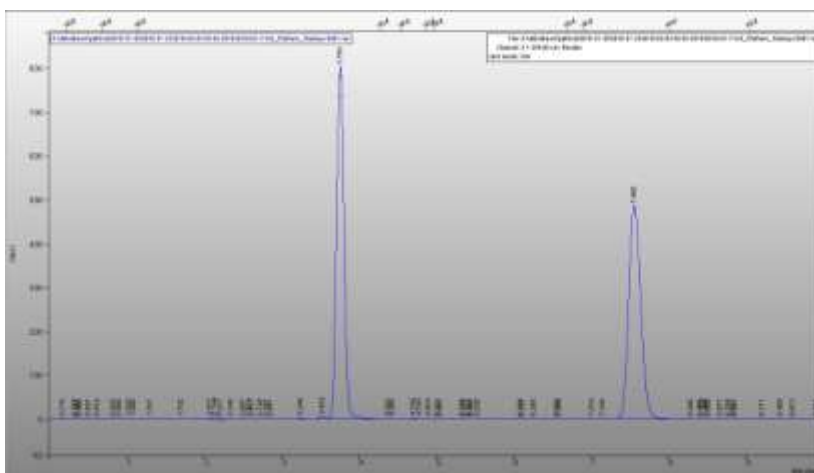


Figura A.16: Cromatograma CLAE 254nm para 6) $C_6 = 2,03 \times 10^{-4}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

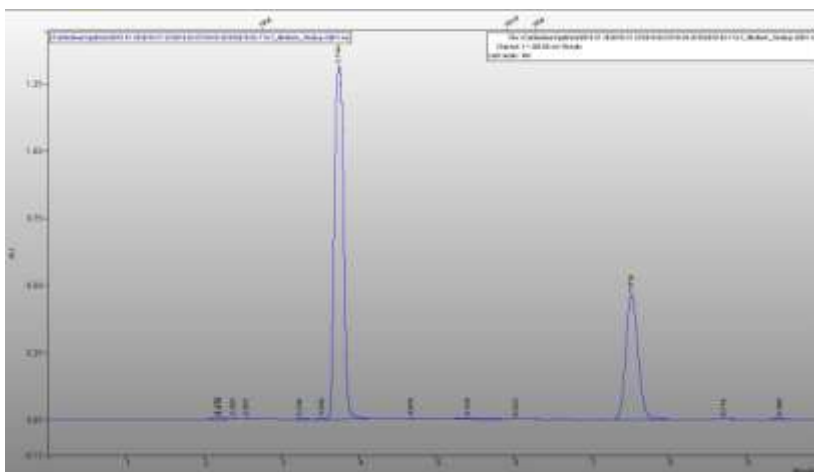


Figura A.17: Cromatograma CLAE 205nm para 7) $C_7 = 2,32 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

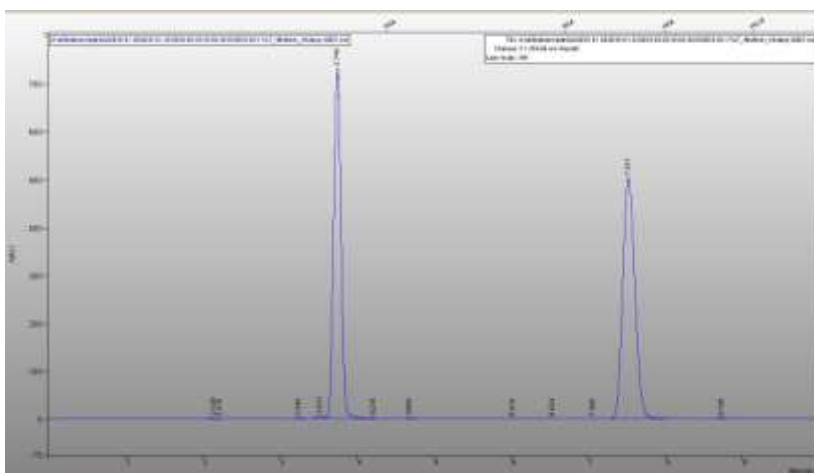


Figura A.18: Cromatograma CLAE 254nm para 7) $C_7 = 2,32 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

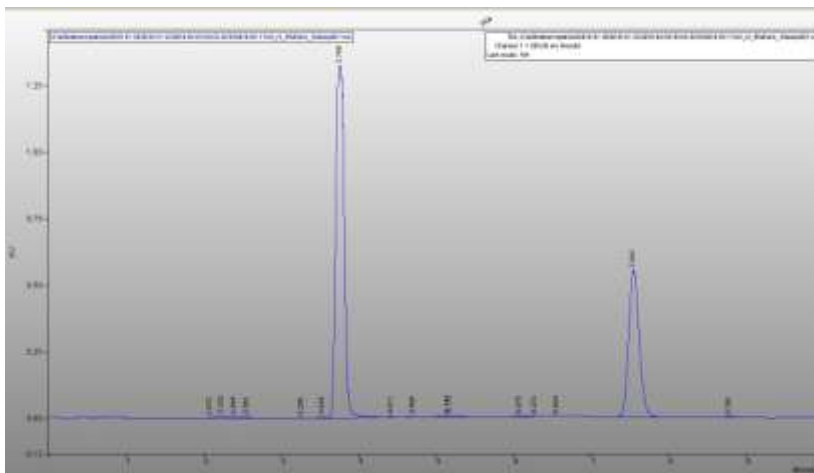


Figura A.19: Cromatograma CLAE 205nm para 8) $C_8 = 2,61 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

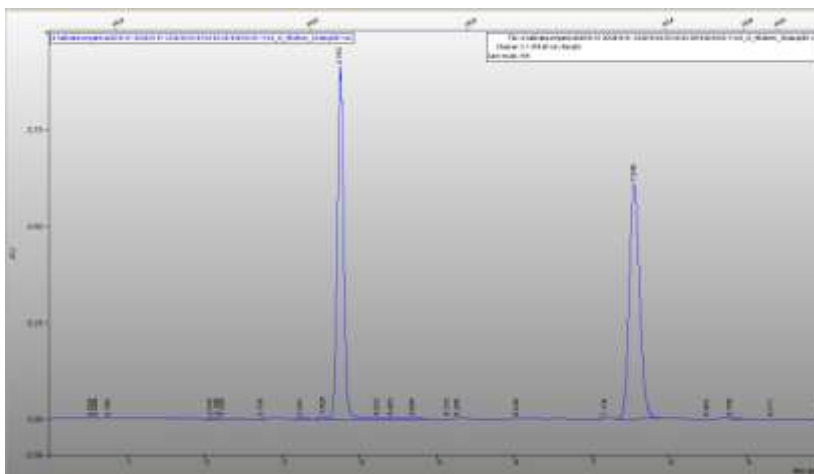


Figura A.20: Cromatograma CLAE 254nm para 8) $C_8 = 2,61 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

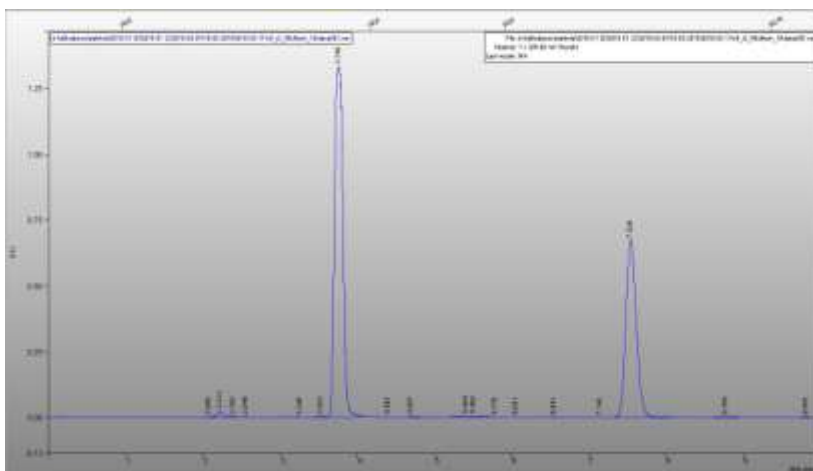


Figura A.21: Cromatograma CLAE 205nm para 9) $C_9 = 2,90 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

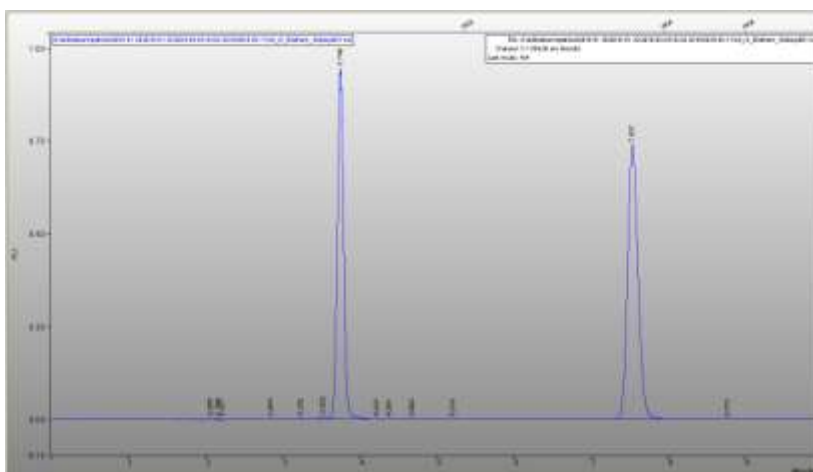


Figura A.22: Cromatograma CLAE 254nm para 9) $C_9 = 2,90 \times 10^{-4}$
 $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

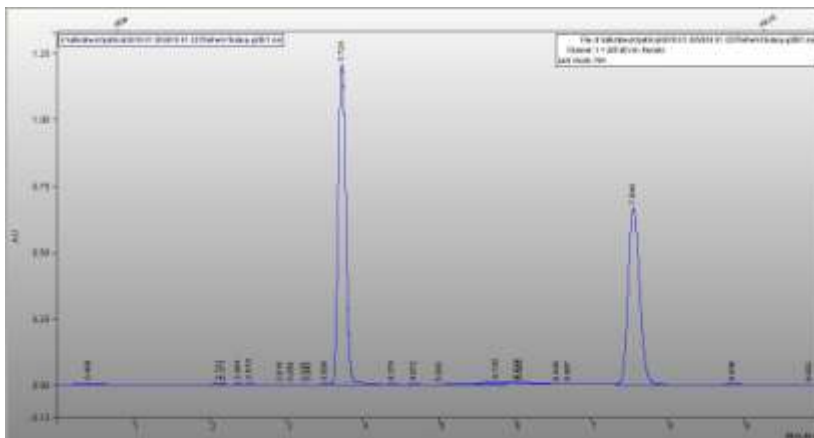


Figura A.23: Cromatograma CLAE 205nm para 10) $C_{10} = 4,06 \times 10^{-4}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

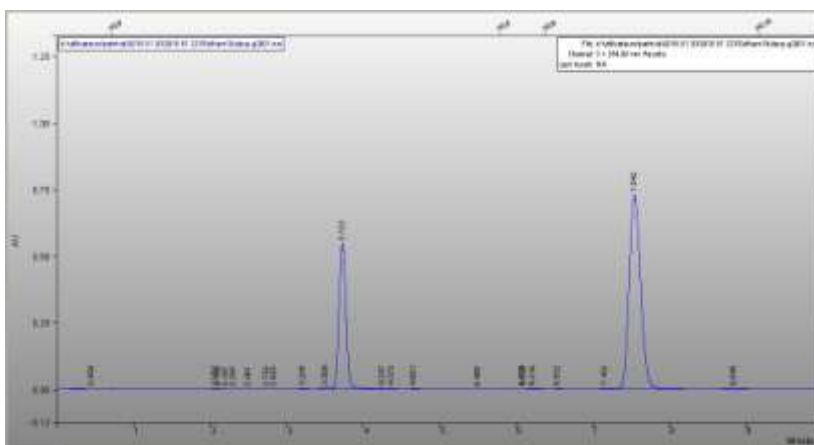


Figura A.24: Cromatograma CLAE 254nm para 10) $C_{10} = 4,06 \times 10^{-4}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

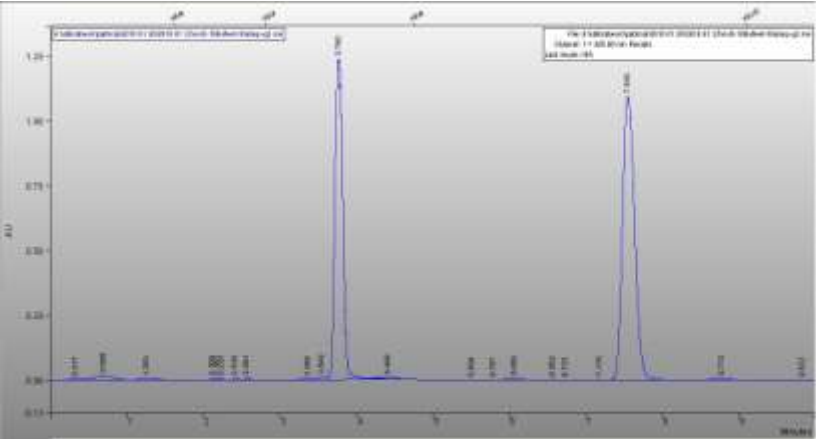


Figura A.25: Cromatograma CLAE 205nm para 11) $C_{11} = 5,80 \times 10^{-4}$ $\text{mg}_{\text{hernandulcin}}/\mu\text{L}_{\text{ACN}}$.

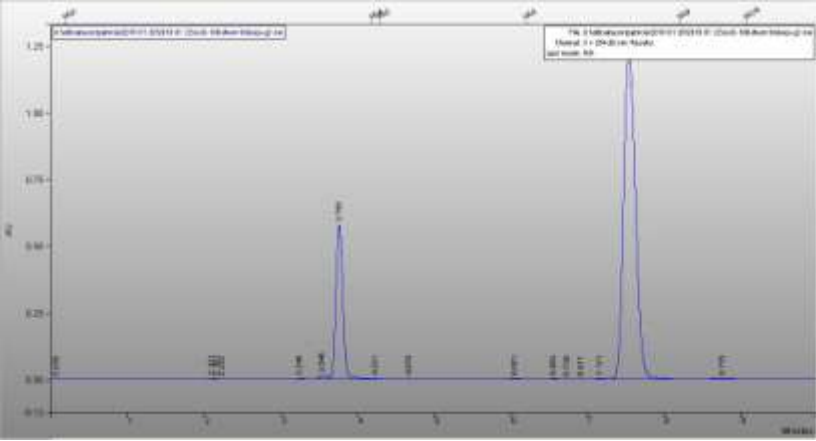


Figura A.26: Cromatograma CLAE 254nm para 11) $C_{11} = 5,80 \times 10^{-4}$ mg_{hernandulcin}/μL_{ACN}.

APÊNDICE B – Cromatogramas CG/MS e espectros de massas dos padrões analíticos analisados

A seguir, nas Figuras B.27, B.28 e B.29, são apresentados os cromatogramas e espectros de massas dos padrões analíticos de limoneno, cariofileno e α -bisabolol, respectivamente. Essas análises foram realizadas utilizando a Metodologia 3, descrita no item 4.7.1, do Capítulo 4 deste documento.

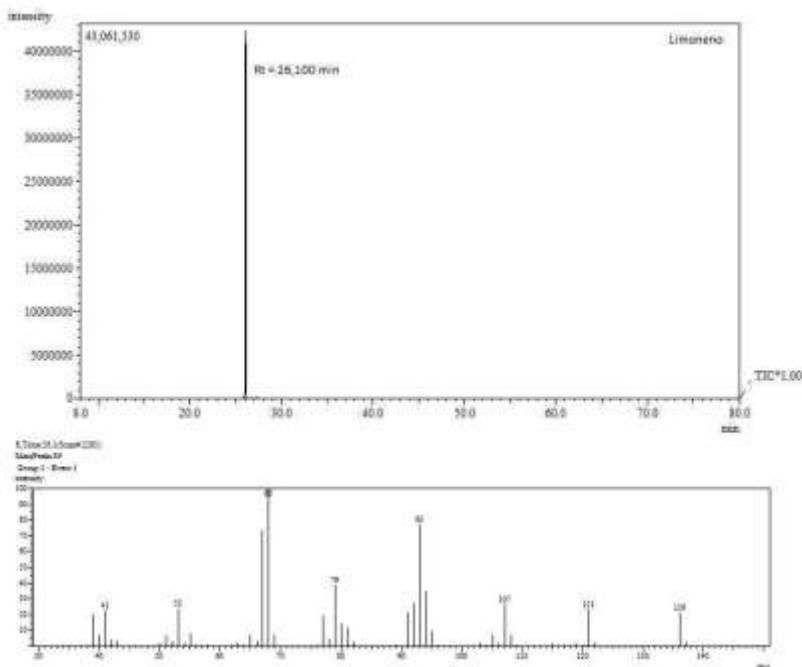


Figura B.27: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de limoneno.

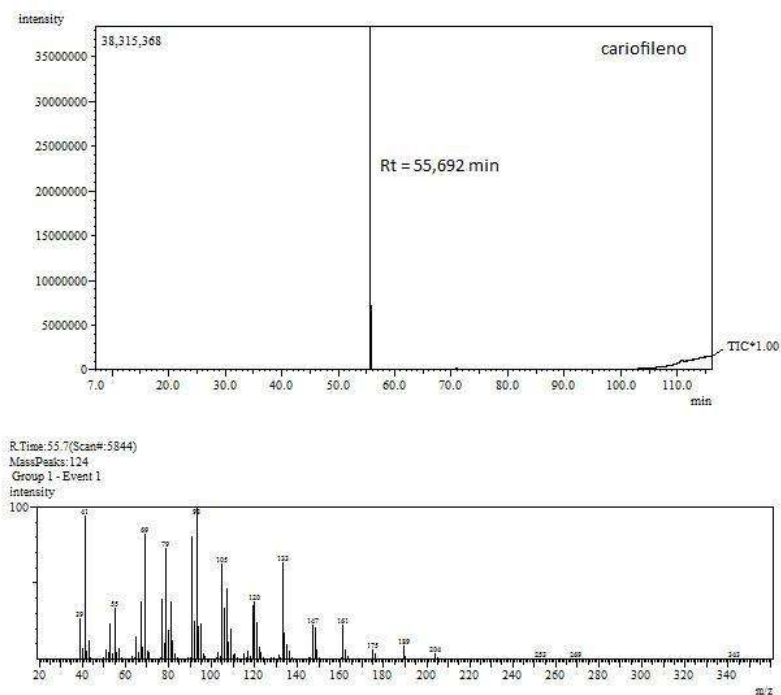


Figura B.28: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de cariofileno.

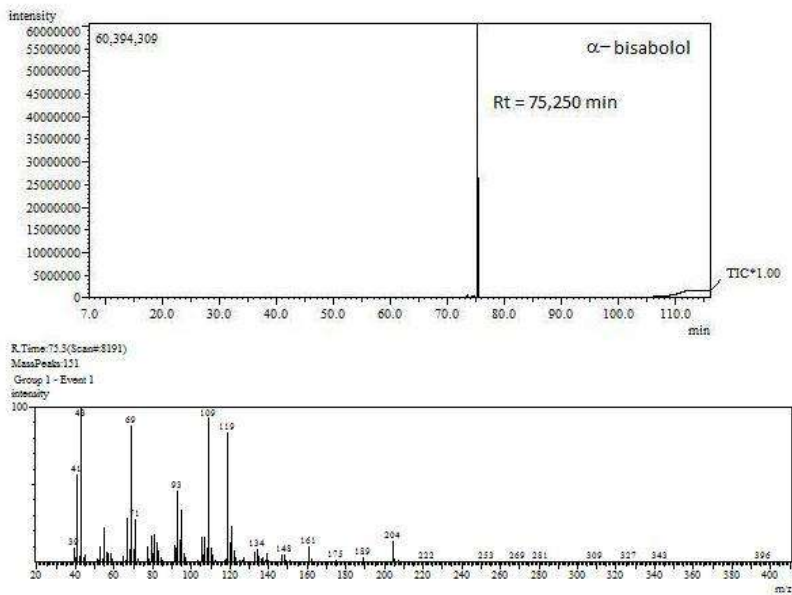


Figura B.29: Cromatograma de íons e espectro de massas do padrão analítico de α -bisabolol.